

**ANALYSE AUTOKRINER WIRKUNGEN VON HLA-G AUF
TROPHOBLASTZELLEN**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr.med.)

Vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

2011

Von arsène Dzonang Nzondjou
geboren am 26.08.1980 in Mbouda (Kamerun)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Udo R. Markert.
2. Frau PD Dr. Uta Ch. Hipler.
3. Prof. Dr. Udo Jeschke.

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.12.2011

Dieses Heft widme ich meiner Familie

Inhaltsverzeichnis.....	I-III
1 Verzeichnis der Abkürzungen.....	IV-VII
2 Einleitung.....	1
2.1 Hintergrund über die Immunologische Toleranz der Mutter gegenüber Frucht und Plazenta.....	1
2.2 Beginn der menschlichen Entwicklung.....	2
2.3 Die Befruchtung.....	3
2.4 Die Implantation.....	4
2.5 Entwicklung der Plazenta.....	5
2.6 Aufbau der abgestoßenen reifen Plazenta.....	6
2.7 Funktion der Plazenta.....	6
2.8 Einige Abnormalitäten der Plazenta.....	6
2.9 Immunzellen in der Plazenta.....	7
2.9.1 NK-Zellen.....	7
2.9.1.1 NK-Zellmerkmale.....	7
2.9.1.2 Funktion der uNK-Zellen.....	9
2.9.2 T-Lymphozyten.....	9
2.9.3 Antigen präsentierende Zellen (APC).....	10
2.10 Zytokine in der Plazenta.....	10
2.10.1 STAT.....	12
2.10.2 SHP2.....	12
2.10.3 SOCS.....	12
2.10.4 Interleukin-6.....	13
2.10.5 Interleukin-10.....	13
2.11 Der Trophoblast kann funktionell mit einem Organismus verglichen werden.....	14
2.12 Die Plazenta als allogenes Gewebe.....	14
2.13 Bedeutung von HLA-G.....	15
2.13.1 MHC-Moleküle.....	15
2.13.2 MHC-Klasse-I-Moleküle.....	15
2.13.3 Unterschiede zwischen MHC-Klasse-Ia und MHC-Klasse-Ib-Molekülen.....	16
2.13.4 MHC-Klasse-II-Moleküle.....	18

Inhaltsverzeichnis

2.13.5	MHC-Klasse-III-Moleküle.....	18
2.13.6	Struktureller Aufbau von HLA-G.....	18
2.13.7	Funktion von HLA-G in der Plazenta.....	20
2.13.8	Lösliche HLA-G.....	21
2.14	Heutige Vorstellung über die Fetomaternale Toleranz.....	22
2.14.1	T-Zellapoptose.....	22
2.14.2	TNF-related apoptosis inducing ligand (TRIAL).....	22
2.14.3	Indoleamine 2,3-dioxygenase.....	23
2.14.4	Regulatorische T-Zellen.....	23
2.14.5	Inhibierende Wirkung von MHC-Klasse-Ib-Molekülen auf mütterliche Immunzellen.....	24
3	Zielsetzung.....	25
4	Materialien und Methoden.....	26
4.1	Kultivierung der Zellen.....	26
4.2	Prinzip der RNA-interference.....	26
4.3	Protokoll der siRNA-Transfektion.....	28
4.4	Protokoll des Western Blotes.....	29
4.4.1	Bradford-Proteinbestimmung.....	30
4.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	30
4.4.3	Bloten und Filmentwicklung.....	32
4.4.4	Prinzip der ECL-Methode.....	33
4.5	Prinzip und Protokoll des Proliferationsassays.....	34
4.6	Prinzip und Protokoll des Apoptoseassays (PARP-Assay).....	35
5	Ergebnisse.....	37
5.1	Ergebnisse des Western Blotes.....	37
5.2	Ergebnisse des Proliferationsassays.....	38
5.3	Ergebnisse des Apoptoseassays (PARP-Assay).....	40
6	Diskussion.....	42
6.1	Einfluss der siRNA auf die HLA-G-Expression.....	42
6.2	Schutz vor dem Immunsystem durch die HLA-G-Expression.....	43
6.3	Proliferation durch Transfektion von JEG-3 Zellen mit siRNA-HLA-G/1.....	43

Inhaltsverzeichnis

6.4 Einfluss von löslichen HLA-G und IL-6 auf die Proliferation von nicht- und transfizierten JEG-3 Zellen.....	45
6.5 Die siRNA-Transfektion von JEG-3 Zellen führt zu einer leichten Zunahme der Apoptose.....	46
6.6 Einfluss von IL-10 auf die Apoptose.....	47
6.7 Einfluss von HLA-G siRNA-Transfektion auf die Invasion von JEG-3.....	48
7 Zusammenfassung.....	49
8 Literaturverzeichnis.....	51
9 Publikationen.....	63
10 Lebenslauf.....	63
11 Danksagung.....	65
12 Ehrenwörtliche Erklärung.....	66

1 Verzeichnis der Abkürzungen

Ang-2: Angiopoietin-2
APS: Ammoniumpersulfat
Aqua dest: destilliertes Wasser
ATP: Adenosintriphosphate
ATPase: Adenosintriphosphatase
Bp: Basenpaare
BSA: Bovine Serum Albumine
CD: cluster of Differentiation
C/EBP: CCAAT-enhancer-binding proteins
c-fos: cellular-fibroblast-homosapiens
CIS: cytokine-inducible SH2 containing proteins
c-jun: cellular-jun-onkogen
CLIP: Class-II-associated invariant chain peptid
c-myc: cellular-myelocytomato-se-onkogen
CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor
CO₂: Kohlendioxyd
CRH: Corticotropin-releasing Hormon
Da: Dalton
DC: Dendritische Zellen
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
d.h: das heißt
DISC: death inducing signalling complex
dNK: deziduale natürliche Killer
E: elektrische Feldstärke
ECL: Enhanced chemiluminescence
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGF: epidermal growth factor
Epo: Erythropoetin
ER: Endoplasmatisches Retikulum

Verzeichnis der Abkürzungen

EVT: Extravillöser Trophoblast
f: Reibungskoeffizient
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting
FKS: fetales kalb Serum
GH: Growth Hormon
GM-CSF: Granulozyte/Makrophagen-Colony Stimulating Factor
GnRH: Gonadotropin-releasing Hormon
Grb-2: Growth factor receptor-bound protein 2
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution
hCACTH: humane Chorioncorticotropin
hCG: humane Choriongonadotropin
HCl: Salzsäure (Chlorwasserstoff)
hCT: humane Chorionthyrotropin
HGF: hepatocyte growth factor
HLA: Human Leucocyte Antigene
hPL: humane placental Laktogen
HWZ: Halbwertszeit
H₂O: Wasser
H₃PO₄: Phosphorsäure
IFN-Gamma: Interferon Gamma
Ig: Immunglobulin
IKK: inhibitor of kappaB kinase
IL: Interleukin
ILTs: Ig-like transcripts
Jak: Janus kinase
JH: Janus-homology domain
KD: Kilodalton
KIR: Killer Ig-like Rezeptor
KAR: Killer aktivierender Rezeptor
LIF: Leucämia inhibitory Factor
M: Mol
MAPK: Mitogen-activated protein kinase

Verzeichnis der Abkürzungen

MEM-G/1: Mouse Monoclonal Antibody to HLA-G
mg: miligramm
MHC: Major Histocompatibility Complex
min: Minute
ml: mililiter
mM: milimol
m-RNA: messenger Ribo-Nukleinsäure
MTS: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium, inner salt
n: Viskosität
NADH: Nicotinamid Adenin Dinucleotid Hydroeen
NaOH: Natronlauge (Natriumhydroxid)
NF-kappaB: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK: natürliche Killer
nm: nanometer
nM: nanomol
OSM: Oncostatin M
PAGE: Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP-Assay: Poly ADP-Ribose Polymerase-Assay
PES: Phenazine Ethosulfate
PIAS: Protein inhibitor of activated Stats
Pim-1: Protoonkogen Pim-1
PI3'-K: phosphatidylinositol 3' kinase
PLGF: Placental Growth Factor
pNK: periphere natürliche Killer
Prl: Prolaktin
PVDF: Polyvinylidenfluorid
r: Radius
RA: Rheumatoide Arthritis
Raf: Ras-activated factor
Ras: Rat sarcoma
Rh-: Rhesus

Verzeichnis der Abkürzungen

RISC: RNA-induced silencing Complex
ROS: reactive oxygen species
SCR: Scramble
SDS: Sodium Dodecyl-Sulfat
SH2: Src-homology 2
SHP2: SH2-Domänen enthaltende Protein-Tyrosin-Phosphatase 2
Si-RNA: RNA interference
Smac/DIABLO: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low PI
SOCS: Supressors of cytokin signaling
sog.: sogenannte
SOS: Son of sevenless
STAT: Signal transducer and activator of transcription
TAP: Transporter associated with antigen Processing/Presentation
TcR: T-cell receptor
TEMED: N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β : Transforming growth factor beta
Th1/2: T helper cell 1/2
TNF-a: Tumor Necrosis Factor-alpha
TPO: Thyreoperoxidase
TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U: Umdrehung
uNK: uterine natürliche Killer
V: Wanderungsgeschwindigkeit
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
Z: Nettoladung des Proteins
z.B: zum Beispiel
 μ l: mikroliter
II: Pi
°C: Grad

2 Einleitung

2.1 Hintergrund über die immunologische Toleranz der Mutter gegenüber Frucht und Plazenta

Eine der Hauptaufgaben des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen Selbst und nicht-Selbst. Vom genetischen Standpunkt aus können Frucht und Plazenta als Semiallotransplantat aufgefasst werden, da sie väterliche Transplantationsantigene besitzen, die nicht mit den mütterlichen übereinstimmen. Es kommt jedoch bei einer normalen Schwangerschaft nicht zu Unverträglichkeitsreaktionen zwischen Mutter und Fetus, wie sonst sie bei Transplantation zu beobachten sind. Mehrere Hypothesen existieren bisher, die das Fehlen einer Transplantationsimmunität zwischen Mutter und Fetus erklären können. Dennoch war Peter Brian Medawar der erste, der 1953 das Konzept des fetalen Allotransplantats vorschlug, um das immunologische Verhältnis zwischen Mutter und Fetus zu erklären. Medawar schlug drei Ursachen vor, warum das semiallogene Transplantat, das ein halfremdes Gewebe ist, von der Mutter nicht abgestoßen wird: Erstens, es gibt eine anatomische Trennung des Fetus von der Mutter. Zweitens, der Fetus besitzt unreife Antigene. Drittens, die Immunsuppression während der Schwangerschaft. Der von ihm behauptete einzige wichtigste Faktor für die erfolgreiche Schwangerschaft war die anatomische Barriere zwischen Mutter und Fetus. Es stimmt allerdings, dass mütterliche und kindliche Blutzirkulation immer getrennt von einander sind und sich nicht vermischen. Aber der Begriff der Barrieremechanismus der Plazenta ist nur teilweise zutreffend, denn sowohl mütterliches Ig G als auch Lymphozyten können in den fetalen Kreislauf gelangen. Außerdem wurde auch schon von fetalen Zellen wie z.B. fetale hämatopoetische Zellen und mononukleare Zellen aber auch fetale DNA berichtet, die dem mütterlichen Blutkreislauf eingetreten waren und sogar immer Jahre bis Jahrzehnte bei der Mutter noch nachweisbar waren (Cody A. Koch et al., 2007). Damit wird die Plazenta eine gewisse Porosität gegenüber Zellen zuerkannt. Die Theorie, die davon ausgeht, dass die fetalen Antigene während der Schwangerschaft noch eine gewisse Unreife besitzen und deshalb das mütterliche Immunsystem nicht entsprechend darauf reagiert konnte auch nicht aufrechterhalten werden, weil sich die trophoblastspezifischen Antigene und die Transplantationsantigene im Verlauf der Ontogenese in sehr frühen Stadien herausbilden. Bei Menschen bilden sich z. B. die

Isoantigene der Blutgruppen im ersten Schwangerschaftstrimenon heraus. Es gelangen zahlreiche fetale und trophoblastäre Substanzen in den mütterlichen Kreislauf, die eine Immunantwort auslösen können. Ein klassisches Beispiel ist die Rhesusinkompatibilität. Die Hypothese, die postuliert, dass während der Schwangerschaft der mütterliche Organismus eine reduzierte immunologische Reaktionsfähigkeit aufweist, wurde auch verlassen. Eins steht aber fest: Die mütterliche Immunantwort ändert sich während und nach der Schwangerschaft. Es konnte in den unterschiedlichen Schwangerschaftstrimena eine Ab- oder Zunahme von verschiedenen Lymphozytensubpopulationen nachgewiesen werden (Watanabe M. et al., 1997). Die Ursache dieser Veränderungen bleibt weiterhin unklar. Es wurde lange Zeit vermutet, dass der Uterus ein immunologisch privilegierter Ort ist, der Frucht und Plazenta gegenüber dem mütterlichen Immunsystem abschirmt. Beer und Billingham konnten 1970 zeigen, dass Transplantate von Haut-, Zungen- sowie Vaginalepithelien unter endogenem Östrogeneinfluss des graviden Rattenuterus besser migrierten im Vergleich zu denselben Transplantaten in nicht-gravidem Rattenuterus, die mit exogenem Östrogen behandelt wurden. In Abwesenheit vom Östrogen kam es zur Abstoßung der meisten Transplantate. Im Gegensatz zum Uterus werden z.B. Hirn, Vorderkammer des Auges und die Testes als immunologisch privilegierte Orte bezeichnet, da sie aufgrund ihrer anatomischen Barriereeigenschaft den Zugang von Zellen des Immunsystems verhindern. Außerdem exprimieren die Zellen vom Auge und Testes Fas Ligand (FasL/CD95L), die in Wechselwirkung mit Fas-Rezeptor von aktivierten Lymphozyten treten und fördern die Apoptose der T-Lymphozyten (Griffith TS. et al., 1995). Es wird auch angenommen, dass mütterliche plazentagängige und blockierende Antikörper die in Trophoblasten und fetalen Geweben exprimierten Antigene maskieren. Somit sollen die Antigen-Antikörper-Komplexe fetale und Trophoblastzellen vor zytotoxischen mütterlichen Lymphozyten schützen.

2.2 Beginn der menschlichen Entwicklung

Die vorgeburtliche Entwicklung des Menschen beginnt mit der Befruchtung (Fertilisation). D.h. die Vereinigung vom Spermium (der menschliche Gamet) mit der Oozyte (der weibliche Gamet) zu einer einzelnen Zelle, der Zygote. Die Bildung und Reifung der Gameten findet schon lange Zeit vor der Befruchtung statt. Die Eizelle reift im Ovar des Fetus schon ab der 13. SSW heran (Oogenese), wird aber erst bei der Ovulation ausgestoßen. Diese Eizelle ist durch die Zona Pellucida eingehüllt und von Granulosazellen der Corona radiata umgeben. Die Spermien werden im Hoden gebildet und ihre Differenzierung erfolgt erst nach der Pubertät. Dann werden sie im Nebenhoden gespeichert. Durch die Ejakulation während der Kohabitation gelangen einige

hundert Millionen Spermien in die Vagina. Die Befruchtung findet in der Ampulla der Tuba uterina statt und muss innerhalb von 24 Stunden nach der Ovulation erfolgen, da eine Eizelle nur so lange befruchtungsfähig bleibt. Spermien können ihre Befruchtungsfähigkeit bis zu 48 aufrechterhalten. Frisch ejakulierte Spermien sind nicht in der Lage, eine Eizelle zu befruchten. Sie müssen zunächst eine Phase der Konditionierung bzw. einen Reifungsprozess durchlaufen. Dies dauert etwa sieben Stunden und wird als Kapazitation bezeichnet. Dabei werden auf den Spermien sitzende Glykoproteinschicht und Seminalproteine aus dem Ejakulat entfernt.

2.3 Die Befruchtung

Nur kapazitierte Spermien können die Corona radiata durchdringen und an der Zona pellucida die Akrosomreaktion durchlaufen. Die Akrosomreaktion wird von Proteinen der Zona Pellucida induziert: Die Zellmembran des Spermiums verschmilzt punktförmig mit der Membran des Akrosoms. In der Verschmelzungszone entstehen Poren, durch welche die akrosomalen Enzyme Hyaluronidase und die Protease Akrosin austreten können. Diese Enzyme bahnen durch Auflösung der Zona pellucida den Weg zur Eizelle. Ist das Spermium in die Eizelle eingedrungen, lösen sich in der Rindenzone der Eizelle in einer Kettenreaktion präformierte zytoplasmatische Vesikel und schütten ihren Inhalt in den Perivitellinen Raum zwischen Eizelle und Zona pellucida aus (kortikale Reaktion). Die Zona pellucida ändert schlagartig ihre Struktur. Dabei werden wahrscheinlich spezifische Rezeptoren für die Spermien unzugänglich (Zona pellucida-Reaktion). Dieser Vorgang wird als Polyspermieblock bezeichnet. Durch die Befruchtung wird die zweite Reifeteilung der Eizelle durch die Bildung des weiblichen Vorkerns vollendet. Der Befruchtungsvorgang wird mit der Vereinigung des weiblichen und männlichen Vorkerns beendet. Das Ergebnis der Befruchtung ist die Zygote. Während der Passage durch den Eileiter in Richtung Uterus durchläuft die Zygote die Furchung (mehrere aufeinanderfolgende mitotische Teilungen) und teilt sich in zahlreiche kleinere Zellen, die Blastomeren. Etwa drei Tage nach der Befruchtung erreicht eine Zellkugel, die Morula (lat. Morus = Maulbeere), die aus ungefähr 16 bis 32 Blastomeren besteht, den Uterus. Bald darauf bildet sich innerhalb der Morula ein Flüssigkeitsgefüllter Hohlraum. Dadurch wird sie zur Blastozyste. Diese besteht ersten aus einer inneren Zellmasse, dem Embryoblast, aus dem das menschliche Embryo hervorgeht. Zweitens aus der Blastozystenhöhle. Drittens aus einer äußeren Zellschicht, dem Trophoblasten, der den Embryoblasten und die Blastozystenhöhle umschließt. Nachdem sich die Zona pellucida

etwa am vierten oder fünften Tag nach der Befruchtung aufgelöst hat, lagert sich die Blastozyste mit der dem Embryoblast benachbarten Trophoblastschicht an das Epithel des Endometriums (etwa 5.-6. Tag). Die Trophoblastzellen dringen in das Uterusepithel und in das darunterliegende Gewebe ein und werden als Synzytiotrophoblasten bezeichnet. Gleichzeitig entwickelt sich an der freien Oberfläche des Embryoblasten eine Schicht aus zunächst kubischen, dann flachen Zellen, der Hypoblast; die übrigen darüberliegenden Zellen werden nun als Epiblast bezeichnet. Am Ende der ersten Woche ist die Blastozyste oberflächlich in das Endometrium implantiert.

2.4 Die Implantation

In der zweiten Woche kommt es zu starker Proliferation und Differenzierung des Trophoblasten. Die Veränderungen des Endometriums, die als Anpassung des mütterlichen Gewebes an die Implantation entstehen, werden als deziduale Reaktion bezeichnet. Diese besteht erstens aus dem Zytotrophoblast innen, und außen dem Synzytiotrophoblast. Zweitens entwickelt sich innerhalb des Synzytiotrophoblast Lakunen. Dies führt zu einer lakunäres Hohlraumsystem. Drittens arrodiert der Trophoblast die mütterlichen Sinusoide. Viertens fließt Blut in das lakunäre Hohlraumsystem, wodurch sich eine primitive uteroplazentare Zirkulation ausbildet. Fünftens bilden sich primäre Zotten. Wenn der Keim vollständig in das Endometrium eingebettet ist, so ist die Implantation abgeschlossen. Es bildet sich dann parallel der primäre Dottersack, welcher sich in den sekundären Dottersack umwandelt. Außerdem entsteht eine Amnionhöhle. Der Embryoblast differenziert sich in die zweiblättrige Keimscheibe, die aus dem Epiblast und dem Hypoblast besteht. Schließlich entwickelt sich die Prächordalplatte, woraus sich der Kopf später entwickelt.

2.5 Entwicklung der Plazenta

Die Plazenta besteht zu Beginn des 4. Monats aus zwei Anteilen:

1. einem fetalen Anteil, der aus dem Chorion frondosum hervorgeht, und
2. einem mütterlichen Anteil, der im wesentlichen aus der Decidua basalis besteht.

Insgesamt sind aber drei Anteile der Decidua zu unterscheiden: Die Decidua basalis liegt zwischen dem Embryo und dem Myometrium, die Decidua capsularis zwischen Embryo und Uteruslumen und als Decidua parietalis wird die restliche Decidua bezeichnet. Trophoblastanteile, die an die Decidua capsularis grenzen, wachsen wegen der schlechten Ernährungssituation nur wenig. Trophoblasten, die an das Myometrium grenzen, wachsen aufgrund besserer Durchblutung rasch. Aus dem extraembryonalen Mesenchym und dem Trophoblast entsteht das Chorion. Das Chorion, das an der Decidua capsularis anliegt, entwickelt sich nur langsam. Sie wird als Chorion laeve bezeichnet. Das Chorion, das an der Decidua Basalis anliegt, wächst stark und bildet das Chorion frondosum. Es ist aus Synzytiotrophoblast, Zytotrophoblast und extraembryonalem Mesenchym aufgebaut. Der Synzytiotrophoblast entsteht durch Fusion der darunterliegenden Zytotrophoblasten. Es bildet eine einreihige Zellschicht, die für den Transfer von materno-fetalen Nährstoffen und Abfallprodukten verantwortlich ist. Außerdem werden von diesem placentäre Hormone gebildet. Der Synzytiotrophoblast ist bis zum Ende der Schwangerschaft nachweisbar, nicht aber der Zytotrophoblast. Dieser ist in der zweiten Schwangerschaftshälfte nicht mehr nachweisbar, da er in den stark wachsenden Synzytiotrophoblast inkorporiert wird. Der kindliche Anteil der Plazenta ist das Chorion, das aus einer Chorionplatte besteht. Aus der Chorionplatte entspringen die Sekundärzotten. Chorionzotten kommen entweder als freie Zotten vor oder werden als Haftzotten an der Decidua basalis verankert. Der Aufbau ist in beiden Fällen gleich. Die Zotten baden im mütterlichen Blut der Lakunen des intervillösen Raumes und ihre Oberfläche stellt die Austauschfläche aller Stoffe zwischen mütterlichem und kindlichem Organismus dar. An der Decidua basalis, der mütterliche Anteil der Plazenta, verlaufen die arteriellen Gefäße, die in die Lakunen münden und die venösen Gefäße, die das Blut aus den Lakunen aufnehmen. Mütterliches und kindliches Blut sind in aller Regel immer getrennt und vermischen sich nicht. Allerdings wird gegen Ende der

Schwangerschaft, wenn der Zytotrophoblast verschwunden ist, die Plazentaschranke (z.B. von Blutzellen) durchlässiger.

2.6 Aufbau der abgestoßenen reifen Plazenta

Am Ende der Schwangerschaft hat die Plazenta die Form einer Scheibe von 15-25 cm Durchmesser, etwa 3cm Dicke und wiegt 500-600g. Bei der Betrachtung der dezidualen, mütterlichen Seite lassen sich 15-20 leicht erhabene Areale, die Kotyledonen, unterscheiden. Die Furchen zwischen den Kotyledonen werden durch die Deziduasepten hervorgerufen. Die fetale Oberfläche der Plazenta hat keine Kotyledonenstruktur und wird von der Chorionplatte gebildet. Man sieht eine große Anzahl von Arterien und Venen, die Choriongefäße, die zur Nabelschnur hin konvergieren.

2.7 Funktion der Plazenta

Die Hauptfunktionen der Plazenta sind der Ernährungsstoffwechsel (z.B. Glykogen-, Cholesterin- und Fettsäuresynthese), der Gas und Stofftransport (z.B. O₂, CO₂, CO), die endokrine Sekretion (z.B. hCG, hPL, hCT, hCACTH, Parathyroidhormone-released Protein, GnRH, CRH, Growth-hormone-releasing Hormon, Somatostatin, Mineralokortikoide, Steroidhormone wie Östrogen und Progesteron), der Transfer von Nährstoffen (z.B. Vitamine) und Antikörpern. Eine normal funktionierende Plazenta stellt eine wichtige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und die gesunde Entwicklung des Embryos dar.

2.8 Einige Abnormalitäten der Plazenta

Die Nabelschnur inseriert gewöhnlich exzentrisch und gelegentlich sogar marginal. Selten inseriert sie in der Chorionmembran außerhalb der Plazenta (insertio velamentosa). Abnorm sitzende Plazenta werden als Plazenta accreta, Plazenta percreta und Plazenta praevia bezeichnet. Bei der Plazenta accreta haftet die Plazenta fest am Myometrium. Bei der Plazenta percreta haften die Plazentazotten die gesamte Dicke des Myometriums oder sogar das Perimetrium. Man spricht von einer Plazenta Präevia, wenn die Plazenta den inneren Muttermund vollständig verlegt.

2.9 Immunzellen in der Plazenta

Die Dezidua beinhaltet unterschiedliche Arten von Immunzellen: die T-Lymphozyten, uNK, APC (Monozyten/Makrophagen, DC). B-Lymphozyten und Granulozyten sind ungewöhnlich für das Endometrium und die Dezidua, können aber in einem geringeren Prozentsatz vorkommen.

2.9.1 NK-Zellen

NK-Zellen sind Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Sie gehören zu den Lymphozyten. Ihre Hauptaufgabe ist die Immunantwort gegen Viren oder Tumore. Viren- und tumorbefallene Zellen reduzieren die MHC-I- Expression auf ihre Zelloberflächen. Dies wird von NK-Zellen erkannt und die Apoptose bzw. Zytolyse der Zielzelle wird eingeleitet.

2.9.1.1 NK-Zellmerkmale

Man unterscheidet zwischen peripheren Blut NK-Zellen ($CD56^{\text{dim}}CD16^+$ pNK, $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ pNK) und uterinen NK ($CD56^{\text{bright}}CD16^-$ uNK, $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ uNK). Während zum Ende des ersten Trimenons über 70% der uterinen Lymphozyten NK-Zellen sind, sind nur 10% der peripheren Lymphozyten NK-Zellen. Die $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ pNK-Zellen exprimieren relativ wenig CD56 an ihrer Zelloberfläche, aber die Dichte von CD16 ist hoch. Sie machen 90-95% der gesamten peripheren NK-Zellpopulation aus. Die $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ pNK-Zellen haben eine höhere Dichte von CD56 und eine geringere Dichte von CD16 auf der NK-Zelloberfläche, aber machen nur 10-15% der gesamten peripheren NK-Zellpopulation aus. Die $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ pNK-Zellen sind zytotoxischer als die $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ pNK-Zellen. Beide peripheren Zelltypen können Zytokine bilden. Die meistens uNK-Zellen sind $CD56^{\text{bright}}CD16^-$, während nur eine geringere Anzahl von uNK-Zellen $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ sind. uNK-Zellen kommen zahlreich im frühen graviden Uterus vor aber ihre Zahl nimmt stetig während der Schwangerschaft ab. Es gibt Unterschiede zwischen $CD56^{\text{bright}}$ -Zellen des peripheren Blutes und $CD56^{\text{bright}}$ -Zellen im Uterus: Alle $CD56^{\text{bright}}$ -Zellen des peripheren Blutes sind agranuliert während $CD56^{\text{bright}}$ -Zellen der Dezidua sowohl granuliert als auch agranuliert sind. Während $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ pNK-Zellen agranuliert sind, sind $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ pNK-Zellen granuliert. Die uterinen NK-Zellen werden

wiederum in endometrialen NK-Zellen und dezidualen NK-Zellen unterteilt (Manaster and Mandelboim., 2008). Die menschlichen eNK kommen beim nicht-graviden Endometrium während dem Menstrualzyklus vor. Ihre Zahl nimmt von der proliferativen zu der späten sekretorischen Phase des Menstrualzyklus zu (Starkey et al., 1991). eNK-Zellen exprimieren einige Marker wie z.B. CD9CD151, die auch in den dezidualen NK-Zellen exprimiert werden, aber weder bei CD56^{dim} pNK- noch bei CD56^{bright} pNK-Zellen vorkommen. Außerdem exprimieren eNK-Zellen kein L-Selektin, das aber bei CD56^{bright} CD16- pNK-Zellen vorhanden sind. Somit können die eNK als einzigartige NK-Zellen betrachtet werden. Die eNK werden als Zellen mit geringeren zytotoxischen Aktivität angesehen. Ungewiss ist, ob sie auch wie die dNK-Zellen eine Remodeling-Eigenschaft besitzen. Die dNK-Zellen kommen im graviden Endometrium vor. Man vermutet, dass sie die differenzierte Form von eNK-Zellen sind. Bei Menschen sind etwa 70% der dezidualen Lymphozyten CD56^{bright}CD16- NK-Zellen. Die dNK-Zellen besitzen einige einzigartigen Merkmale, die sie von CD56^{bright} CD16- pNK-Zellen unterscheiden. Z.B.: das Fehlen von L-Selektin und die Expression von CD69. Während dNK-Zellen sowohl inhibierende als auch aktivierende Rezeptoren exprimieren, besitzen die CD56^{bright} CD16- pNK-Zellen nur aktivierende Rezeptoren aber keine KIR. Obwohl dNK-Zellen sowohl Granula mit Perforin und Granzym A/B als auch KAR besitzen und damit potenzielle zytotoxische NK-Zellen sind, zerstören sie nicht die Trophoblastzellen aufgrund der Interaktion zwischen KIR und nicht polymorphen MHC-Klasse-Ib-Molekülen (HLA-G, HLA-E). Die Rezeptoren der dNK-Zellen gehören zu vier großen Familien (Indira Guleria et al, 2007):

a) Der Killer Ig-like Receptor (KIR): sie können bei der Bindung an MHC-I-Molekülen sowohl aktiviert als auch inhibiert werden. Zu den inhibierenden Rezeptoren gehören: (KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2). Zu den aktivierenden Rezeptoren zählen: (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DS1). z.B. HLA-G ist Ligand für KIR2DL4, HLA-B-Moleküle sind Ligande für KIR3DL1, HLA-C1-Moleküle sind Ligande sowohl für inhibierende KIR2DL2/3 als für akti

vierende KIR2DS2 während HLA-C2-Moleküle Ligande sowohl für inhibierende KIR2DL1 als auch für aktivierende KIR2DS1.

b) Der C-Type lectin Rezeptor (CD94/NKG, NKp80): sie können auch sowohl aktiviert als auch inhibiert werden. Der inhibierende Rezeptor ist CD94/NKG2A, der HLA-E erkennt. Der aktivierende Rezeptor ist CD94/NKG2C. NKp80 ist ein aktivierender Rezeptor.

c) Die Ig-like Transcripts (ILTs): sie bilden eine Familie von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Die meistens MHC-Klasse-I-Moleküle binden ILTs.

d) Die natural cytotoxic Receptors (NCRs): hierzu gehören nur aktivierende Rezeptoren wie NKp30, NKp44, NKp46, 2B4 und die NKG2D.

NK-Zellen kommen auch in anderen Organen oder Geweben wie z.B. die Lymphknoten, das Knochenmark, die Leber, die Lunge, etc. Man vermutet, dass die Aktivierung von Chemokinrezeptoren und Adhäsionmolekülen von NK-Vorläuferzellen zu ihrer Wanderung vom Knochenmark über das periphere Blut in das Zielorgan z.B. den Uterus führen. Dort proliferieren und differenzieren sie sich unter den Einfluss von Zytokinen.

2.9.1.2 Funktion der uNK-Zellen

uNK-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der fetalen Implantation und der erfolgreichen Plazentation in der frühen Schwangerschaft. Durch die Interaktion zwischen MHC-Klasse-I-Molekülen und dNK werden eine Reihe von Zytokinen/ Chemokinen und angiogenetischen Faktoren gebildet wie z.B. GM-CSF, TNF-alpha, LIF, IFN-gamma, CSF-1, IL-8, IL-10, Ang-2, VEGF-C, PlGF (Rieger et al., 2002). Insbesondere IFN-gamma und angiogenetische Faktoren sind an der Regulierung der Trophoblastsinvasion und des dezidualen arteriellen Remodelings beteiligt (Plaisier et al., 2007; Margaret et al., 2005). Die Folge des vaskulären Remodelings ist eine Zunahme der Blutversorgung der fetoplazentaren Einheit. Dies geschieht durch die Abnahme des Gefäßwiderstands und die Zunahme der Aufnahmefähigkeit.

2.9.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind vorhanden in der Decidua und sind wichtig für die Immunantwort. In der Decidua kommen folgende T-Lymphozytensubpopulationen vor: CD3+T, CD4+T, CD8+T (Saito

S., 2000). Sie produzieren Th1-Zytokine (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IFN-gamma, TNF-alpha) und Th2-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF) (Challis JR. et al., 2009). Während Th1 Zytokine für die Schwangerschaft schädlich sind und eine Rolle im reproduktiven Versagen spielen, stimulieren Th2-Zytokine die Trophoblastproliferation und Invasion und tragen damit zu einer erfolgreichen Schwangerschaft bei (Hill JA. et al., 1995). Während einer normalen Schwangerschaft beobachtet man eine Hemmung der Th1-Zytokinbildung durch die Th2-Lymphozyten (Wegmann et al., 1993). Mittels regulatorischer T-Zellen und der T-Zellapoptose spielen T-Lymphozyten eine wichtige Rolle in der Immuntoleranz des semiallogenen Fetus. Ein Paradox in der Reproduktionsimmunologie ist die Tatsache, dass das polymorphe MHC-Klasse-Ia-Molekül HLA-C nicht von T-Zellen erkannt und folglich der Trophoblast zerstört wird.

2.9.3 Antigen präsentierende Zellen (APC)

Die beiden Population von APC der Dezidua sind Makrophagen und DC. Monozyten/Makrophagen können als Reinigungszellen der Plazenta aufgefasst werden, denn sie phagozytieren Zelltrümmer (Bulmer et al., 1984). Sie produzieren außerdem Zytokine wie TGF- β und CSF, die zu einer erfolgreichen Schwangerschaft beitragen. Eine andere Funktion ist die Immunsuppression durch Bildung von Prostaglandin E₂, die wiederum die Tc-Lymphozyten und uNK-Zellen inhibieren (Parhar et al., 1988). DC spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort, indem sie extrazelluläre Proteine phagozytieren und sie als MHC-Klasse-II-Antigen präsentieren. Sie sind auch beteiligt in der Immuntoleranz gegen den semiallogenen Fetus durch Sekretion von Zytokinen wie IL-10 oder durch die Expression von inhibierenden Rezeptoren (Kämmerer et al., 2004). Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Zahl von unreifen DC mit fortschreitender Schwangerschaft drastisch steigt. Dies spiegelt die Rolle der DC für den Erfolg der Schwangerschaft wieder (Kämmerer et al., 2003).

2.10 Zytokine in der Placenta

Die Zytokine in der Plazenta stammen hauptsächlich aus vier Zelltypen: T-Lymphozyten, APC (Monozyten/Makrophagen, DC), uNK-Zellen, Trophoblasten. Zytokine können strukturell in 4

Einleitung

Gruppen unterteilt werden: die 4-alpha Helix Familienmitglieder (IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, LIF, TNF-alpha und GM-CSF); die IL-1 Familie (IL-1, IL-18); die IL-17 Familie und die Chemokine (CC-, CXC-, CX3C-, XC-Familienmitglieder). Während IL-10 sechs Helices enthält, besitzen IL-5 und IFN-gamma acht Helices. Deshalb wäre eine hilfreichere Unterteilung die funktionelle Gruppierung in Th1- und Th2-Zytokine (Challis JR. et al., 2009). Sie können entweder mit dem Zytokinrezeptor Typ I oder mit dem Zytokinrezeptor Typ II in Wechselwirkung treten (Gadina M. et al., 2001). Zu den Zytokinen, die am Typ I-Rezeptor binden, gehören: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, GM-CSF, G-CSF, LIF, CNTF, OSM, GH, Prl, Epo, TPO, Leptin. Am Typ II-Rezeptor binden IFN, IL-10 und IL-20. Durch die Interaktion von Zytokinen mit ihren Rezeptoren regulieren sie über Signaltransduktionskaskade die Zellproliferation und Differenzierung (Touw IP. et al., 2000). Sie kontrollieren die Trophoblastinvasion und Migration (Dubinsky V. et al., 2010). Somit sind die Zytokine ein wichtiger Bestandteil des parakrinen und autokrinen Kommunikationsnetzwerks, das sich innerhalb der fetomaternalen Grenzfläche ereignet und können zu einer erfolgreichen Schwangerschaft beitragen. Zytokine kontrollieren und regulieren die HLA-G-Expression von menschlichen Trophoblastzelllinien (Yang Y. et al. 1995; Grabowska A. et al. 1990). Zytokine regulieren das Plazentawachstums und schützen der Fetus vor pathologischen Organismen (Bowen JM., 2002). Man vermutet, dass Störungen in der intrauterinen Zytokinenproduktion um die Implantation herum die Ursache des Aborts und der abnormalen Trophoblastentwicklung sind (Dimitriadis E. et al., 2005; Bowen JM., 2002). Nicht zuletzt spielen sie eine Rolle in der Austreibungsphase der Geburt, der Amnionsackruptur und der Zervixdilatation (Bowen JM., 2002). Die meisten bekannten intrazellulären Signaltransduktionskaskaden von vielen Zytokinen erfolgen über den Jak/STAT-Signalweg und Ras/Raf/MAPK-Signalweg. Man assoziiert den Defekt des Jak/STAT-Signalweges mit der Erkrankung an Leukämie, Lymphom und vererbten Immundefizienz (Heim MH., 1999). Es gibt 4 Typen von Janus Kinasen (Jaks): Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2. Die Jaks bestehen strukturell aus insgesamt 7 Domänen (JH1, JH2, JH3, JH4, JH5, JH6, JH7). Während die C-terminale JH1-Domäne enzymatische Aktivitäten besitzt, hat die JH2-Domäne (Pseudokinase-/ Kinase-like-Domäne) keine. Die Funktion der Domänen JH3-JH7 ist noch unbekannt (Chen E. et al., 1999). Durch die Zytokin-Zytokinrezeptorinteraktion werden Jaks durch Phosphorylierung aktiviert. Die aktivierten Jaks phosphorylieren ebenso die intrazellulären Tyrosinreste des Zytokinrezeptors. Die Transkriptionsfaktoren STAT (Signal transducer and activator of transcription), SHP2 (Die SH2-Domänen enthaltende Protein-

Tyrosin-Phosphatase 2) und PI3'-K (phosphatidylinositol 3' kinase) binden mit ihrer SH2-Domänen (Src-homology 2-Domäne) an phosphorylierte Thyrosinresten des Zytokinrezeptors und werden ebenfalls phosphoryliert. Sie wandern dann in den Kern, wo sie andere Transkriptionsfaktoren wie SOCS, C/EBP, c-myc, c-fos, c-jun, Pim-1 etc. phosphorylieren und somit die Genexpression modulieren (Briscoe J. et al., 1996). Um eine unkontrollierte Zytokinsignaltransduktionskaskade zu verhindern, besitzen Zellen Mechanismen zur Verminderung bzw. Hemmung des Zytokinsignalweges. Dazu gehören die SOCS-Proteine, die PIAS (Protein inhibitor of activated STATs) und die Phosphatasen. Die Phosphatasen dephosphorylieren die Signalfaktoren.

2.10.1 STAT

STATs (Signal transducer and activator of transcription) bestehen strukturell aus einer SH2-Domäne, C- und N-terminalen Domäne, einer zentral DNA-bindenden Domäne und phosphorylierten Thyrosinresten. Es sind 7 STAT-Proteinen bekannt: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 (O'Shea JJ., 1997). Die STATs haben verschiedene Funktionen. Während STAT1 als Tumorsuppressor, Proliferationshemmer und Apoptoseförderer gilt, machen z.B. STAT3 und STAT5 das Gegenteil (Bromberg J. et al., 2000).

2.10.2 SHP2

Die SHP2 (Die SH2-Domänen enthaltende Protein-Tyrosin-Phosphatase 2) besteht strukturell aus einer Phosphatasedomäne und zwei N-terminalen Domänen. SHP2 kann am Rezeptor binden, dann rekrutiert sie Grb-2 und SOS und somit wird die Ras/Raf/MAPK-Kaskade eingeleitet. Sie kann auch andere Signalwege aktivieren, wie z.B. NF-kappaB.

2.10.3 SOCS

SOCS-Proteine (Supressors of cytokine signaling) sind, wie der Name schon vermuten lässt, Inhibitoren der Signaltransduktion von Zytokinen. Es sind 8 SOCS-Proteine bekannt: CIS (cytokine-inducible SH2 containing proteins), SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6 und SOCS7 (Gadina M. et al., 2001). Strukturell besitzen sie eine SH2-Domäne, eine C- und N-

terminale Domäne. Sie hemmen die Zytokinsignaltransduktion sowohl über Markierung und anschließenden Abbau der Signalproteine im Proteasom als auch über direkte Hemmung der enzymatischen Aktivität der Janus Kinasen (Krebs DL. et al., 2001). Sie spielen möglicherweise eine Rolle in der Reproduktion und Plazentaentwicklung. Insbesondere führen SOCS3-Knockout bei Mäusen zu Plazentainsuffizienz mit der Folge des Fruchttodes (Fitzgerald JS. et al., 2009). SOCS-Proteine sind Schlüsselregulatoren in inflammatorischen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis (RA), Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, und ihr Spiegel bei allergischen Erkrankungen ist hoch (Crocker BA. et al., 2008).

2.10.4 Interleukin-6

Interleukin-6 ist ein Zytokin der 4-alpha Helix Familie. Es ist ein 184 Aminosäuren lang biologisch aktives Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 26 KDa. IL-6 wird von vielen Zellen produziert: z.B. Th1-Lymphozyten, Makrophagen, NK-Zellen, Trophoblasten, etc. Es kann sowohl proinflammatorisch als auch antiinflammatorisch wirken. Durch die Bindung am Zytokinrezeptor Typ I, der aus einem ligandbindenden IL-6R-alpha(CD126)/sIL-6R-alpha und einem Signaltransduktionsbestandteil gp130 (CD130) besteht, wird der intrazelluläre Jak/STAT-Signalweg und die SHP2/Ras/Raf/ERK/MAPK Signaltransduktionskaskade ausgelöst (Heinrich PC. et al., 2003).

2.10.5 Interleukin-10

Interleukin-10 ist ein Zytokin mit sechs alpha Helices. Menschliches homodimeres IL-10 ist ein 178 Aminosäuren langes, biologisch aktives und nicht glykosiliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca 18 KDa. IL-10 wird von Th2-Lymphozyten, allen Antigen präsentierenden Zellen, NK-Zellen und Zytotrophoblasten gebildet. Fibroblasten, BeWo, JAR und JEG-3-Zellen exprimieren kein IL-10 (Roth I. et al., 1996). Cadet P. et al. konnten aber schon 1995 IL-10 mRNA in JAR nachweisen. Bennett WA. et al. bewiesen 1997 zwar die Expression von IL-10 mRNA in mit GM-CSF stimulierten BeWo Zellen, aber nicht in JEG-3 Zellen. Dong Q. et al. konnten 2009 eine IL-10-Produktion in JEG-3 Zellen feststellen, wenn eine Überexpression von SOCS-3 Genen besteht. IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin. Es

bindet am IL-10R-alpha und löst über Aktivierung von Jak1 und Tyk2 eine intrazelluläre Signalkaskade aus. IL-10 übt eine immunsuppressive Wirkung auf das mütterliche Immunsystem aus (Thaxton JE. et al., 2010; Roth I. et al., 1996) und hemmt auf den autokrinen Weg die Zytotrophoblast-MMP-9-Produktion und -Invasion (Roth I. et al., 1999; Pang ZJ. et al., 2008).

2.11 Der Trophoblast kann funktionell mit einem Organismus verglichen werden

Von vielen wird der Trophoblast und die sich entwickelte Plazenta als ein Hilfsorgan zur Ernährung des später sich entwickelnden Embryos angesehen, das mit dem Embryo selbst nichts zu tun hat und nach der Geburt abgestoßen wird. Dies ist aber ein einseitiger Gesichtspunkt, der den tatsächlichen Verhältnissen nicht ganz gerecht wird. Betrachtet man den Trophoblasten unter funktionellen Gesichtspunkten, muss man feststellen, dass in diesen Trophoblasten alle für einen lebendigen Organismus charakteristischen Funktionen ablaufen. So findet hier der Gasaustausch wie in der Lunge, die Exkretion von Stoffwechselprodukten und Elektrolyten wie in der Niere, die Resorption von Nahrungsstoffen wie im Magen-Darm-Kanal und die für Wachstum und Entwicklung so notwendigen Stoffwechselvorgänge wie in der Leber, die endokrinen Steuerungsprozesse wie im späteren Endokrinium und schließlich sogar die Blutbildung, aber nur in der frühen Schwangerschaft, statt. Damit erfüllt der Trophoblast, vor allem der Synzytiotrophoblast alle organismischen Funktionen, ohne spezielle Organe dafür zu besitzen. Das Zytoplasma des Synzytiums, in dem die Zellkerne regellos verteilt sind, besitzt Mikrovilli für die Resorption der Nahrungsstoffe, spezifische Zellorganellen für Proteinsynthese bzw. Proteinabbau, Mitochondrien, und endoplasmatisches Retikulum. Der Trophoblast ist sehr gut mit Membranrezeptoren ausgerüstet, welche diesem eine Informationsaufnahme der Umgebung ermöglichen. Somit kann er auf Hormone und Zytokine, die autokrin oder aus anderen Zellen bzw. Organen produziert werden, reagieren.

2.12 Die Plazenta als allogenes Gewebe

In Bezug auf die Mutter kann man die Plazenta als Semiallotransplantat ansehen, da fetale Plazentaanteile sowohl väterliche als auch mütterliche Gene besitzen. Der Fetus besitzt also MHC-Molekülen, die zur Hälfte von beiden Elternteilen stammen. Im intervillösen Raum steht der Synzytiotrophoblast der Chorionzotten im Kontakt mit den mütterlichen Abwehrzellen, aber ihm fehlen MHC-Antigene (Chumbley et al., 1993). Die extravillösen Trophoblastanteile der

Verbindungszone, die in die Decidua basalis und die mütterliche Spiralarterien eindringen, exprimieren dagegen die nicht polymorphen (Klasse-Ib-) Antigene HLA-G, HLA-E, HLA-F. Der EVT exprimiert auch das polymorphe (Klasse-Ia-) Antigen HLA-C aber keine MHC-Klasse-II-Antigene (Hunt et al., 2005). Warum das vom Vater stammende HLA-C in situ trotz der Polymorphie nicht abgestoßen wird, bleibt noch unklar. Es wurde aber schon berichtet, dass das polymorphe HLA-C im Vergleich zu anderen MHC-Klasse-Ia-Moleküle in einer sehr niedrigeren Konzentration gebildet wird und dass die Antigenpräsentations-Fähigkeit relativ schwach ist. Die Funktion von HLA-F ist noch unbekannt.

2.13 Bedeutung von HLA-G

HLA-G wurde vor ungefähr 20 Jahren zum ersten Mal beschrieben und war somit das erste identifizierte Antigen der MHC-Klasse-Ib-Molekülen auf Trophoblastzellen. Es beschäftigt seither die Immunologen, insbesondere die Reproduktionsimmunologen.

2.13.1 MHC-Moleküle

MHC-Moleküle sind genetisch festgelegte Strukturen, die an der Oberfläche von Körperzellen exprimiert werden und dienen der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen. Zellen mit körperfremden Antigenen binden an TcR und werden von T-Zellen zerstört. Die Zellen mit körpereigenen Antigenen werden von T-Zellen geschont. Dies nennt man Selbsttoleranz, die den Körper vor Angriffen des eigenen Immunsystems schützt. Man unterscheidet drei Klassen von MHC-Molekülen: Klasse I, Klasse II, Klasse III. Die Genen aller drei Moleküle befinden sich auf dem Chromosom 6 mit Ausnahme des Gens von β 2-Mikroglobulinuntereinheit des MHC-I-Moleküls, das auf Chromosom 15 liegt.

2.13.2 MHC-Klasse-I-Moleküle

Sie bestehen aus einer extrazellulären Glykoproteinkette mit drei Domänen (α 1, α 2, α 3) aus jeweils ca. 90 Aminosäuren und ein β 2-Mikroglobulin, das nicht kovalent an der Glykoproteinkette gebunden ist. Darüber hinaus bestehen sie aus einer hydrophoben

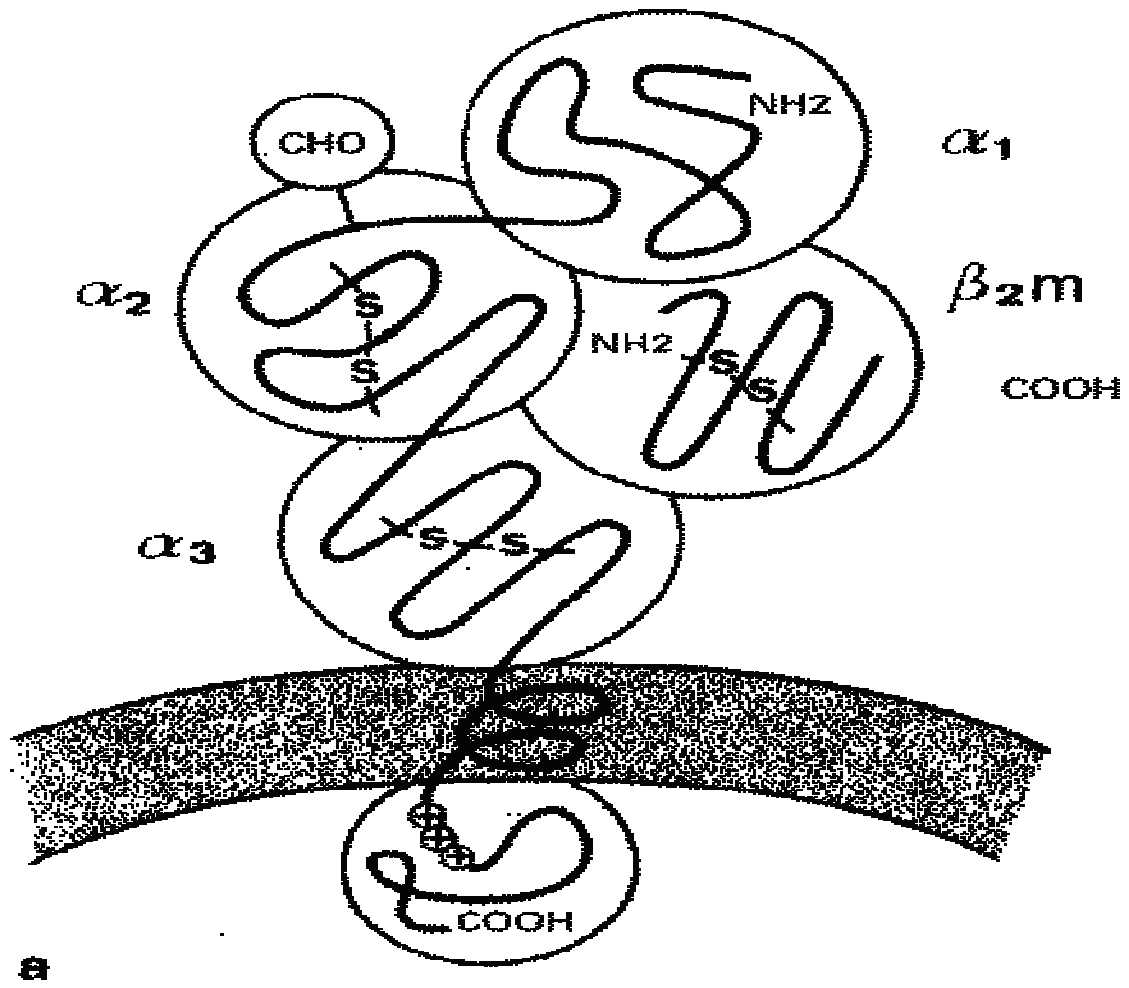
transmembranären Region der schweren Glykoproteinkette, die sich aus ca. 40 Aminosäuren zusammensetzt. Letztlich aus einem 30 Aminosäuren bestehenden intrazellulären Segment (Geraghty et al., 1987). Die α -Untereinheiten des MHC-I-Moleküls und das β_2 -Mikroglobulin werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. MHC-Klasse-I-Moleküle kommen auf alle kernhaltigen Zellen vor. Sie dienen der Präsentation sowohl von körpereigenen als auch von viralen Proteinen. Diese Proteine müssen aber vorerst im Zytosol ubiquitiniert werden, d.h. markiert werden. Dann folgt die Fragmentierung im Proteasom (wichtigster nicht lysosomaler Proteasekomplex). Aus den Proteinen entstehen Peptiden, die durch das Heterodimer TAP1/TAP2 des ERs transportiert werden. Dieser Peptidtransporter ist ATPase gesteuert. Im ER ermöglichen die Chaperone Calnexin, Calreticulin und Tapasin die Übertragung von Peptiden auf MHC-Klasse-I-Moleküle (Cresswell et al., 1999; 2005). Das Peptid bindet zwischen der $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domäne des MHC-I-Moleküls. Schließlich wird der MHC-Peptidkomplex im Golgiapparat und über Vesikel an die Zelloberfläche transportiert, wo er am CD8+Rezeptor der T-Zelle präsentiert wird. Dies löst eine Immunreaktion aus. MHC-Klasse-I-Moleküle werden in zwei Klassen unterteilt:

- 1) Die MHC-Klasse-Ia (HLA-A, HLA-B, HLA-C)
- 2) Die MHC-Klasse-Ib (HLA-E, HLA-F, HLA-G)

Beide MHC-Klassen kommen sowohl als membrangebundene als auch als lösliche Formen vor (Puppo F. et al., 2002).

2.13.3 Unterschiede zwischen MHC-Klasse-Ia und MHC-Klasse-Ib-Molekülen

Erstens sind HLA-Klasse-Ia-Moleküle hoch polymorph, während HLA-Klasse-Ib-Moleküle nicht bzw. gering polymorph sind. Das heißt, dass HLA-Klasse-Ib-Moleküle eine geringe Anzahl von Allelen besitzen, z.B. HLA-E (2 Allele); HLA-G (5 Allele); HLA-F (0 Allele). Zweitens werden HLA-Klasse-Ia-Moleküle auf alle kernhaltigen Zellen exprimiert, während HLA-Klasse-Ib-Moleküle organ/gewebespezifisch sind. z.B. für die Plazenta.



www.medicalistes.org/spip/IMG/gif/fig_810_2a.gif

Abb. 1: Schematische Darstellung des MHC-Klasse-I-Moleküls mit den extrazellulären Domänen Alpha-1, 2, 3 und der β₂-Mikroglobulin sowie mit der Transmembran-Domäne und der Zytoplasma-Domäne.

2.13.4 MHC-Klasse-II-Moleküle

Sie bestehen aus zwei membranverankerten Glykoproteinketten mit jeweils zwei extrazellulären Domänen ($\alpha 1$, $\alpha 2$) und ($\beta 1$, $\beta 2$), zwei hydrophoben transmembranären Segmenten und zwei intrazellulären Segmenten. Die α - und β -Untereinheiten des MHC-II-Moleküls werden im ER synthetisiert und über den Golgi Apparat im Endosom in das Zytoplasma freigegeben. MHC-Klasse-II-Moleküle werden nur von APC (Makrophagen, DC, Monozyten, B-Zellen) exprimiert. Durch rezeptorvermittelte Endozytose bzw. Phagozytose werden extrazelluläre Proteine aufgenommen. Sie werden in Phagolysosomen zu Peptiden umgewandelt. Das Phagosom/Phagolysosom verschmilzt mit dem Endosom, welches MHC-II-Moleküle enthält. Die Peptidbindungsstelle des MHC-II-Moleküls, die zwischen der $\alpha 1$ - und $\beta 1$ - Domänen liegt, wird bis zur Verschmelzung des Phagosoms und des Endosoms durch CLIP (Class-II-associated invariant chain peptid) geschützt. Erscheint das Peptid, dann gibt CLIP die Bindungsstelle frei und das Peptid bindet an ein MHC-II-Molekül. Die Folge ist der Transport des MHC-Peptidkomplex an die Zelloberfläche, wo er am CD4+Rezeptor der T-Zelle erkannt wird, was eine Immunantwort auslöst. Bei MHC-Klasse-II-Molekülen, die auch als HLA-D genannt werden, unterscheidet man: HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DZ/DO, HLA-DP.

2.13.5 MHC-Klasse-III-Moleküle

MHC-III- Moleküle sind Serumproteine, die eine relative Ähnlichkeit zu den Komplementfaktoren C2, C4a, C4b, Bf haben. Ihre Loci werden als S-Region bezeichnet. S für Serum und befindet sich genauso wie die vom Komplementfaktoren C2, C4a, C4b auf 6P21.3 des Chromosoms 6. Sie sind wichtig für die Immunantwort.

2.13.6 Struktureller Aufbau von HLA-G

Als Vertreter der sogenannten nicht klassischen MHC-I-Molekülen besitzt das monomere integrale Membranprotein HLA-G prinzipiell eine schwere Glykoproteinkette mit drei Immunglobulinen ähnlichen Domänen ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) und ein $\beta 2$ -Mikroglobulin, das nicht kovalent an der schweren Kette gebunden ist. Das sezenierte Protein β -Mikroglobulin ist 12 KD. schwer

und für den Transport der Klasse- I- Kette an die Zelloberfläche notwendig.

Außerdem enthält HLA-G ein hydrophobes transmembranäres Segment, das fast genauso lang ist wie die klassischen MHC-I-Moleküle HLA-A, -B und C. Trotz der vielen gemeinsamen Merkmalen von HLA-G mit den klassischen MHC-I-Molekülen besitzen HLA-G-Moleküle aber auch einige einzigartige Merkmale, wie ein kurzes zytoplasmatisches Segment aus nur sechs Aminosäuren. Die Folge des verkürzten zytoplasmatischen Schwanzes ist der Verlust des endozytotischen Motivs und damit sowohl eine prolongierte Retention von HLA-G auf die Zelloberfläche als auch eine ineffiziente Präsentation von exogenen Peptiden. HLA-G hat ein Molekulargewicht von 38226 Da und ist im Gene Map Locus 6 P21.3 repräsentiert. Vom HLA-G sind sieben verschiedene Protein- Isoformen bekannt. Sie entstehen durch alternative Spleißen (Moreau P. et al., 1995 und 2002). Drei davon sollen primär deshalb löslich sein, weil durch einen Spleißfehler normal herauszuschneidende RNA-Abschnitte (Sog.“Introns“) in der mRNA verbleiben. Bei der Übersetzung dieser längeren mRNA in Proteinen führen Stopcodons zu einem vorzeitigen Übersetzungsstop und somit zum Verlust der Membranverankerungsdomäne. In Einzelheiten unterscheidet man folgende Isoforme:

- HLA-G1: 38,3KD. Es ist die Isoforme mit voller Länge. Es besteht sowohl aus der Verankerungsdomäne als auch aus extrazellulären Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und das $\beta 2$ -Mikroglobulin (Ishitani und Geraghty, 1992).
- HLA-G2: 27,7KD. Es enthält kein Exon 3, das normalerweise die $\alpha 2$ Domäne kodiert. Dies führt zum Mangel der $\alpha 2$ -Domäne, während die transmembranäre Domäne vorhanden ist (Ishitani und Geraghty, 1992).
- HLA-G3: 17,1KD. Hier fehlen Exon 3 und 4, dies führt zum Verlust der $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domänen, während die transmembranäre Domäne vorhanden ist (Ishitani und Geraghty, 1992)
- HLA-G4: 27,6KD. Hier fehlt das Exon 4, dies führt zum Verlust des $\alpha 3$ -Domänes, während die transmembranäre Domäne vorhanden ist (Kirszenbaum et al., 1994).
- HLA-G5 (sHLA-G1): 36,5KD. Sezenierte Isoform vom HLA-G. Es enthält das Intron 4. Dies führt zum Stopcodon, es bleiben die Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 2$ -Mikroglobuline ohne Verankerungsdomänen. d.h. ohne transmembranäre und intrazelluläre Segmente.
- HLA-G6 (sHLA-G2): 25,9KD. Es enthält das Intron 4, also keine Verankerungsdomäne und kein Exon 3 und damit keine $\alpha 2$ -Domäne.

- HLA-G7 (sHLA-G3): 13,3KD. Es enthält das Intron 2 und nur das Exon 2, damit nur die $\alpha 1$ -Domäne.

HLA-G wird nicht nur in der Plazenta exprimiert sondern in vielen anderen Organen bzw. Geweben wie z.B.: Haut, Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Ovar, Dünndarm, Kolon, Herz, Hirn, Lunge, Leber und Niere (Onno et al., 1994).

2.13.7 Funktion von HLA-G in der Plazenta

Es wird vermutet, dass HLA-G sowohl immunologische als auch nicht immunologische Funktionen in der Plazenta spielt. Als immunologische Funktion wird angenommen, dass HLA-G eine antivirale Aufgabe hätte (Le Bouteiller P., 2000). Es interagiert mit CD8-Molekülen von zytotoxischen T-Zellen, die virusinfizierte Zellen eliminieren. Darüber hinaus besitzt HLA-G die besondere Eigenschaft, unempfindlich gegen den Zytomegalievirus-assoziierten proteolytischen Abbau von MHC-Klasse-I-Proteinen zu sein. Daher wird angenommen, dass die selektive Lokalisation dieses Antigens an der fetomaternalen Grenze dazu beiträgt, virale Angriffe abzuwehren. Eine andere immunologische Funktion von HLA-G ist die Modulation der Aktivität von mütterlichen uterinen Immunzellen. Z.B: uNK-Zellen, T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und DC. HLA-G kann sowohl an KIR2DL4 als auch ILT2 von uNK-Zellen binden, wodurch die zytolytische Aktivität der uNK-Zellen gehemmt wird. HLA-G kann mit T-Zellen interagieren und zur Hemmung von T-Zellen über CD8 bzw. ILT2 führen. Die membrangebundenen und löslichen HLA-G können eine Up-Regulation der Expression von Fas-L und sFas-L-Sekretion an den Trophoblasten auslösen und somit zur CD8+T- und CD8+NK-Zellapoptose führen (Puppo F. et al., 2002; Hunt et al., 2005; Lindaman A. et al., 2006; Naji A. et al., 2007). Es wird angenommen, dass HLA-G eine Schlüsselrolle bei der Implantation spielt, indem es die Zytokinproduktion zur Kontrollen der Trophoblastinvasion und zur aufrechterhaltung der Immuntoleranz moduliert (Kanai T. et al., 2001 und 2003; Roussev RG. et al., 2007). HLA-G interagiert mit ILT2 und ILT4-Rezeptoren von Monozyten bzw. Makrophagen und möglicherweise auch von DC. Wegen der ineffektiven Präsentation von exogenen Peptiden durch HLA-G ist die primäre Funktion von HLA-G nicht die Peptidpräsentation, aber vielmehr die Aufgabe als inhibierendes Ligand für NK-Zellen (Park et al., 2001). Somit vermutet man, dass die inhibierende Wirkung von HLA-G auf Immunzellen zur Immuntoleranz dient. Z.B. das nicht Abstoßen des semiallogenen Fetus durch das mütterliche

Immunsystem. HLA-G stimuliert auch die Expression HLA-E und sein Wiedererkennen durch CD94/NKG2A und/oder CD94/NKG2C der Dezidua. Als nicht immunologische Funktion von HLA-G vermutet man, dass HLA-G eine angiogenetische Wirkung während der Plazentation ausübt (Le Bouteiller P., 2000). Außerdem wird auch angenommen, dass HLA-G an der Zellaggregation und der Zelladhesion beteiligt ist.

2.13.8 Lösliches HLA-G

Es wird angenommen, dass lösliches HLA-G sowohl durch Spleißfehler, wobei Intron 4 und Intron 2 in der mRNA verbleiben (Fujii T. et al., 1994; Paul P. et al., 2000; Hunt Joan S. et al., 2005), als auch durch Abspaltung von membrangebundenem HLA-G1 durch Metalloproteinase entsteht (Blaschitz A. et al., 2005; Park GM. et al., 2004). Während HLA-G5 (sHLA-G1) strukturell alle extrazellulären Domänen (a1, a2, a3) enthält, besitzen HLA-G6 (sHLA-G2) keine a2-Domäne und HLA-G7 (sHLA-G3) keine a2- und a3-Domänen. Sowohl klassische lösliche HLA-Ia-Moleküle (sHLA-A, sHLA-B, sHLA-C) als auch nicht-klassische lösliche HLA-Ib-Moleküle (sHLA-G, sHLA-E und evtl. sHLA-F) sind im Serum vorhanden und ihr Spiegel ist unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen wie z.B. Schwangerschaft, Transplantatabstoßung, akute graft-versus-host-disease (GVHD) nach Knochenmarktransplantation, entzündliche Erkrankungen wie MS (Multiple Sklerose), autoimmune Erkrankungen, virale Infektionen, allergische Erkrankungen, lymphoproliferative Erkrankungen wie der NHL (Non-Hodgkin Lymphom) und Tumore (Puppo F. et al., 2002; Donaghy L. et al., 2007; Sebt Y. et al., 2007; Fainardi E. et al., 2009; Lajoie J. et al., 2009) stark erhöht. Somit vermutet man eine immunologische bzw. immunregulatorische Aufgabe. Lösliche HLA-G können eine Up-Regulation der Expression von Fas-L und sFas-L-Sekretion an den Trophoblasten auslösen und somit zur CD8⁺T- und CD8⁺NK-Zellapoptose führen (Puppo F. et al., 2002; Hunt et al., 2005; Lindaman A. et al., 2006; Naji A. et al., 2007). Bahri R. et al. beschreiben aber 2006, dass lösliche HLA-G nicht die Apoptose alloreaktiver T-Lymphozyten induziert, sondern die Zellzyklusprogression über Akkumulation von p27kip1 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) in T-Lymphozyten hemmt. Lösliches HLA-G von Melanomen beeinträchtigt die gegen die Zielzellen gerichteten lytischen Granula und somit die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen (Lesport E. et al., 2009). Außerdem

hemmen lösliche HLA-G1 deziduale NK-Zellzytotoxizität (Poehlmann TG. et al. 2006). Ein niedriger Spiegel von löslichen HLA-G korreliert mit schwerer Präeklampsie im dritten Trimenon (Hackmon R. et al., 2007). Da der Embryo lösliches HLA-G produziert, wäre sHLA-G als ein potenzieller klinischer Parameter zur Kontrolle des Schwangerschaftsverlaufs bei Präeklampsie bzw. rezidivierendem Abort oder zur Embryoselektion für den Transfer nach IVF (in vito fertilization) zu bedenken (Rizzo R. et al., 2007; Roussev RG. et al., 2007).

2.14 Heutige Vorstellung über die fetomaternale Toleranz

Viele Mechanismen schützen den Fetus vor dem mütterlichen Immunsystem. Dazu gehören die T-Zellapoptose, der TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), die Indoleamine 2,3-dioxygenase, regulatorische T-Zellen und die Expression von nicht-klassischen MHC-Ib-Molekülen HLA-G und HLA-E auf dem Trophoblast.

2.14.1 T-Zellapoptose

Das Übertreten aktivierter mütterlicher Leukozyten, die väterliche Antigene in der Plazenta erkennen, wird dadurch verhindert, dass apoptoseinduzierende Liganden FasL auf der Trophoblastoberfläche an ihren jeweiligen Rezeptoren auf der Lymphozytenoberfläche binden und dadurch die Zerstörung dieser Lymphozyten auslösen (Kauma SW. et al., 1999; Vacchio MS., 2005). Andere Autoren fanden, dass FasL eher eine Abstoßung des Allotransplantats fördert als es zu tolerieren (Kang SM. et al., 2000). Chaouat G. et al. zeigten 2001, dass Fas/FasL-Interaktion an der plazentären Grenzfläche für die erfolgreiche allogene Schwangerschaft nicht erforderlich ist. Hier sind also noch weitere Studien notwendig.

2.14.2 TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)

TRAIL gehört zur TNF Superfamilie (Phillips TA. et al., 2001). Es schützt den Trophoblast vor apoptotischen Signalen der zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen (Bai X. et al., 2009; Sokolov DI. et al., 2009) und spielt damit eine Rolle in der fetomaternalen Toleranz.

2.14.3 Indoleamin 2,3-Dioxygenase

Indoleamin 2,3-Dioxygenase ist ein Enzym, das den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan katalysiert. Es wird von Trophoblasten, APCs von lymphatischen Organen und Drüsenepithelzellen sowohl von Säugetieren als auch von Menschen synthetisiert. Seine Aufgabe in der Schwangerschaft des Menschen ist noch unklar. Experimente an Mäusen zeigten, dass das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in Trophoblastzellen wesentlich für die Immunprotektion des allogenen Fetus ist. Dies geschieht durch zwei Mechanismen: erstens Indolamin-2,3-Dioxygenase entleert die Tryptophanreserven der Makrophagen, dendritischen Zellen, Monozyten und T-Zellen. Dies führt zur Hemmung der T-Zellproliferation durch Aufhaltung des Zellzyklus in der G1-Phase (Munn et al., 1999). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass sich der Serumspiegel von Tryptophan im ersten Trimenon senkte (Schrocksnadel et al., 1996). Zweitens interagieren die durch Indolamin-2,3-Dioxygenase produzierte Kataboliten von Tryptophan (Kynurenine, 3-Hydroxykynurenine, 3-Hydroxyanthranilic, picolinsäure) mit mütterlichen Immunzellen. Somit werden die Aktivierung und die Proliferation von B-, T- und NK-Zellen unterdrückt (Terness et al, Frumento et al.). Die pharmakologische Hemmung von Indoleamin 2,3-Dioxygenase führte zur T-zellvermittelten Abstoßung von allen allogenen Schwangerschaften bei Mäusen (Munn et al., 1998).

2.14.4 Regulatorische T-Zellen

Die CD4+CD25+ Treg---Zellen kommen sowohl im peripheren Blut als auch in Organen bzw. Geweben wie die Milz, den Lymphknoten, der Dezidua etc. vor (Jin LP. et al., 2009; Zhang N. et al., 2009; Velásquez-Lopera MM. et al., 2008; Heikkinen J. et al., 2004). Sie spielen eine Rolle in der Prävention der Abstoßung des semiallogenen Transplantats (Wood KJ., 2003). Während menschliche CD4+CD25+ Treg---Zellen die Fähigkeit der Immunsuppression haben, sind CD4+CD25- Treg---Zellen zu dieser Aufgabe nicht fähig (Saito S. et al., 2005). Die immunsuppressive Wirkung von Treg---Zellen wird über zwei Mechanismen hervorgerufen (Saito S. et al., 2005). Erstens sowohl durch Zell zu Zellkontakt zwischen CD4+CD25+ Treg---Zellen und konventionelle T-Zellen als auch durch immunsupprimierende Zytokine wie IL-10 und

TGF- β von CD4+CD25+ Treg.---Zellen. Zweitens steigert CTLA-4 auf der Oberfläche von CD4+CD25+ Treg.---Zellen die Expression von Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO) in DC.

Jin LP. et al. konnten 2009 beim Vergleich von CD4+CD25+ Treg.---Zellen von nicht schwangeren, von schwangeren und von Patientinnen mit Spontanabort zeigen, dass die CD4+CD25+ Treg.---Zellen im peripheren Blut von Schwangeren im Vergleich zu nicht schwangeren signifikant steigen. Darüber hinaus wurde auch gezeigt, dass die Proportion von CD4+CD25+ Treg.---Zellen sowohl im peripheren Blut als auch in der Dezidua signifikant beim Spontanabort niedriger ist als bei normaler Schwangerschaft. Sasaki Y. et al. zeigten 2004 auch, dass die Proportion von CD4+CD25+ Treg.---Zellen beim Spontanabort signifikant niedriger ist als beim induzierten Abort. Diese Beobachtungen unterstreichen die bedeutende Rolle, der CD4+CD25+ Treg.---Zellen spielen für die Toleranz der Schwangerschaft.

2.14.5 Inhibierende Wirkung von MHC-Ib-Molekülen auf mütterliche Immunzellen

HLA-G kann sowohl an KIR2DL4 als auch ILT2 von uNK-Zellen binden, wodurch die zytolytische Aktivität der uNK-Zellen gehemmt wird. Außerdem interagiert HLA-G mit T-Zellen, was zur Hemmung von T-Zellen über CD8 bzw. ILT2 führt. Die membrangebundenen und löslichen HLA-G können eine Up-Regulation der Expression von Fas-L an der Trophoblastoberfläche auslösen und somit zur CD8+T-Zellapoptose führen (Hunt et al., 2005). HLA-G interagiert mit ILT2 und ILT4-Rezeptoren von Monozyten/Makrophagen und möglicherweise auch von DC. HLA-E hemmt die zytolytische Aktivität von uNK-Zellen über den HLA-E-Rezeptor CD94/NKG2A.

3 Zielsetzung

Die Fragestellung dieser Arbeit ist zu untersuchen, ob und wie das Molekül HLA-G, das hauptsächlich von Trophoblastzellen produziert wird, auf diese selben Zellen zurückwirkt. Zur Antwort dieser Frage wurde mit der menschlichen Chorionkarzinom-Zell-Linie JEG-3 als Modell für Cytotrophoblastzellen gearbeitet. Das besondere an dieser Zell-Linie ist, dass sie das nicht polymorphe MHC-Klasse-Ib-Molekül HLA-G exprimiert (Rinke de Wit et al., 1990) und im Vergleich zu isolierten menschlichen Trophoblastzellen genetisch definiert ist (Loke YW. et al., 1983). Außerdem vermehren sich JEG-3 Zellen schneller als deziduale Trophoblastzellen und ermöglichen somit eine Reihe von Versuchen mit der gleichen Zell-Linie. Um den Einfluss von HLA-G auf die Trophoblastzellen beurteilen zu können, wurde die HLA-G-Expression in JEG-3-Zellen mittels RNA-Interferenz ausgeschaltet. Als negative Kontrolle wurden nicht transfizierte JEG-3 Zellen und mit nicht genomischer siRNA behandelte Zellen verwendet. Die anderen JEG-3 Zellen wurden mit zwei verschiedenen siRNA-Oligonukleotid-Sequenzen zum „Silencing“ von HLA-G transfiziert. Eine Sequenz richtete sich gegen das gesamte HLA-G, die andere nur gegen HLA-G1 und HLA-G5. Zwei Tage danach wurde der Effekt der Transfektion mittels Western Blot nachgewiesen. Außerdem wurde der Einfluss der Transfektion auf die Proliferation, Apoptose sowie die Invasion und Migration untersucht. Darüber hinaus sollte der Einfluss einer Kombination von Zytokinen und löslichem HLA-G auf die Proliferation und Apoptose untersucht werden.

Zur Analyse des Einflusses der Transfektion und der Stimulation auf die Proliferation wurden zuerst die JEG-3 Zellen in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe blieb nach der Transfektion unstimuliert, die andere wurde nach der Transfektion mit löslichem HLA-G, IL-6 und der Kombination aus löslichem HLA-G und IL-6 stimuliert. Die Stimulation mit IL-6 und löslichem HLA-G erfolgte immer nach der Bestimmung der Zellkonzentration mittels Neubauer-Kammer. Zur Analyse des Einflusses der Transfektion und der Stimulation auf die Apoptose wurden die transfizierten JEG-3 Zellen ebenfalls in zwei Gruppen unterteilt: unstimulierte und mit IL-10 stimulierten JEG-3 Zellen. Die Stimulation mit IL-10 wurde gleich nach der Transfektion durchgeführt und die Messung von gespaltem PARP erfolgte zwei Tagen nach der Transfektion.

4 Materialien und Methoden

4.1 Kultivierung der Zellen

Die JEG-3 Zellen wuchsen in Kulturflaschen in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ heran. Das Kulturmedium DMEM, das als Nährmedium für die Zellen diente und 2% Streptomycin enthielt, musste alle drei Tagen gewechselt werden. Dabei wurden die Zellen auf Kontaminationen wie z.B. Mykoplasmen im Mikroskop untersucht. Waren die JEG-3 Zellen stark angewachsen, mussten sie vom Boden der Kulturflasche mit dem Enzym Trypsin abgelöst, also abtrypsiniert werden und das Zellmediumgemischt musste anschließend verdünnt werden.

4.2 Prinzip der RNA- Interferenz

Die RNA-Interferenz wurde zufällig vor mehr als 15 Jahren von Rich Jorgensen bei dem Versuch der Verstärkung der Farbe von Petunien entdeckt. Er hatte das Protein ermittelt, welches für die Pigmentierung verantwortlich war. Er brachte nur zusätzliche genetische Material in die Zellen der Blüten ein, um die Konzentration des Proteins zu erhöhen. Doch die Blüten zeigten nicht die gewünschte dunkelblaue Farbe, sondern im Gegenteil waren teilweise völlig weiß, Offensichtlich war die Expression der natürlichen Proteine verhindert worden. Doppelsträngige RNA ist normalerweise nicht im Zytoplasma der Zelle vorhanden. Sie kommen erst nach einer Infektion mit einem RNA-Virus vor. Die Zelle hat dagegen einen Abwehrmechanismus: die RNase Dicer (Würfelschneider). Sie spaltet lange dsRNA in kürzere Teilstücke von ca. 20-25 bp. Führt man jetzt im Rahmen des Versuchs siRNA (kleine basenpaare vom c.a 19-24 bp) in die Zelle, geschieht folgendes: Nur eins der beiden Stränge der siRNA, nämlich der führende Strang, wird von einem RNA-induced silencing Complex (RISC) gebunden, dadurch wird seine HWZ verlängert. RISC bindet an die m-RNA deren Sequenz komplementär ist zum im RISC gebundenen siRNA-Strang. Die Target m-RNA wird in der Mitte gespalten und den natürlichen Abbauvorgängen ausgeliefert. Ein RISC-Komplex ist in der Lage, mehrere mRNA-Moleküle zu verdauen.

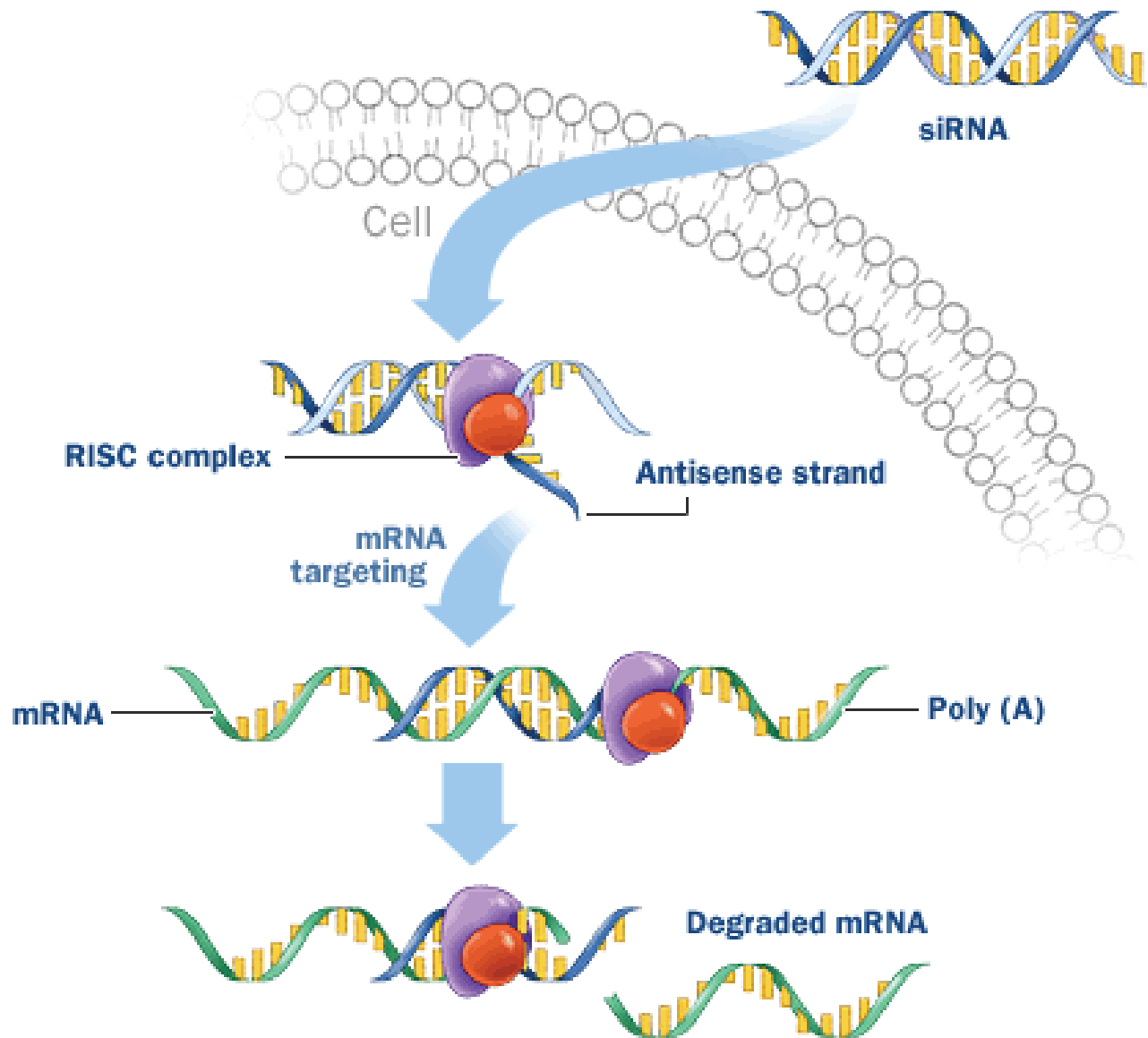


Abb. 2: Vereinfachte schematische Darstellung der RNA-Interferenz

(www.mdrnainc.com/img_rna_interference.gif).

4.3 Protokoll der siRNA-Transfektion

Die JEG-3 Zellen mussten zuerst geerntet werden. Dies geschah durch die Entleerung des verbrauchten DMEM- Kulturmediums. Dann wurden die JEG-3 Zellen mit HBSS gewaschen und anschließend durch die Gabe einer geringeren Mengen von Trypsin abtrypsiniert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 5 Minuten wurde die Kulturflasche geschüttelt und mit ca. 6 ml DMEM- Medium aufgefüllt. Es wurde jeweils 1ml des Zell-Mediumgemisches in eine 6 Well-Platte pipettiert. Dabei war wichtig, dass mindestens 50% des Bodens der 6 Well-Platte mit JEG-3 Zellen am Tag der Transfektion bedeckt war. Dann wurde die 6 Well-Platte für 24 Stunden im Inkubator eingesetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion von JEG-3 Zellen mit Oligonukleotiden. Zunächst stellte man ein Gemisch aus Oligo-Optimem und Oligofectamin-Optimem her. Dafür wurde jeweils 10µl Oligonukleotide (siRNA-SCR, siRNA-HLA-G, siRNA-HLA-G1) zu jeweils 175µl Optimem gegeben und gevortext. Dann wurde jeweils 4µl Oligofectamin zu jeweils 11µl Optimem gegeben und gevortext. Anschließend fügte man das 15µl Oligofectamin-Optimem dem 185µl Oligo-Optimem hinzu und ließ man das Ganze 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Ab jetzt wurden die JEG-3 Zellen aus der 6 Well-Platte des Vortages mit Optimem gewaschen und 800µl Optimem jedem Well hinzugegeben. Nach der 20 Minuten Wartezeit wurde die 200µl Mischung aus Oligo-Optimem und Oligofectamin in jedes Well gegeben. Die 6 Well-Platte wurde dann für mindestens 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde jedem Well 500µl DMEM-Lösung mit 30% FKS unter Ausschluss von Streptomycin hinzugegeben. Damit war der Transfektionsvorgang beendet. Die Endkonzentration der Oligos entsprach dann 66nMol.

Materialien:

Mikroskop (Axiovert 25 Zeiss)

6 Well-Platte (Greiner)

Pipette (10ml), Pipettenspitze (Eppendorf)

Eppendorf tube (Sarstedt)

Vortex-Gerät

Inkubator

Reagenzien:

Oligofectamin

Oligos (Oligonukleotide: siRNA-SCR, siRNA-HLA-G, siRNA-HLA-G1; Ambion)

DMEM-Medium (Bio Whittacker)

FKS (Bio Whittaker)

Optimem (Bio Whittacker)

4.4 Protokoll des Western Blots

Die Gewinnung von Proteinen für den Western Blot erfolgte mindestens zwei Tagen nach der siRNA-Transfektion. Dafür musste zuerst das Medium aus der siRNA-Transfektion entnommen werden. Die transfizierten Zellen wurden mit jeweils 1ml HBSS gewaschen, dann abpipettiert und anschließend abgeschabt und in die entsprechenden Eppendorf Tubes pipettiert. Die erste Zentrifugierung erfolgte für fünf Minuten bei 2500 U/Min. Der Überstand wurde pipettiert und verworfen. Dann fügte man jeweils 100µl 1:10 verdünnte Zelllyse Puffer zu jedem Eppendorf Tube hinzu. Die Eppendorf Tubes wurden anschließend im flüssigen Stickstoff eingefroren, aufgetaut und dann gevortext. Dies wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Danach wurde für 30 min. bei 18000 U/min und 8°C kühlzentrifugiert. Nach dieser zweiten Zentrifugierung wurde der Überstand entnommen, in die entsprechenden Eppendorf Tubes gegeben und im Gefrierfach (-20°C) bis zur Messung aufbewahrt.

Materialien:

Kühlzentrifuge (Heraeus)

Normalzentrifuge (Heraeus)

Eppendorf Tube

Pipettenspitzen

Vortexgerät

Abschaber

Reagenzien:

HBSS = physiologische Kochsalzlösung zum Abwaschen

Cell Lyse-Puffer 1:10 verdünnt (Cell Signaling Technology)

Nach der Proteingewinnung erfolgte die quantitative Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode.

4.4.1 Bradford-Proteinbestimmung

Es ist eine schnelle, einfache und empfindliche Methode der Proteinbestimmung. Unter Lichtausschluss wurden sowohl 5µl der Proteinstandardlösung bekannter Konzentrationen (0; 0.25; 0.5; 0.75; 1; 2; 4mg/ml) als auch 5µl der zu bestimmenden Proteinkonzentration aus der JEG-3 Zelllyse in den Küvetten eingesetzt. Anschließend wurde 1ml Bradfordlösung hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10-15 min bei Raumtemperatur wurde im Spektralphotometer bei der Wellenlänge 595 nm gemessen.

Auswertung: $E_{595} = f(\text{BSA-Menge})$
 $= f(\text{Protein X-Menge})$

Die fertige Bradfordlösung besteht aus dem Farbstoff 25mg Coomassie blue G250, 12,5 ml 95% (v/v) Ethanol und 25ml 85% (w/v) H₃PO₄. 1%(w/v) = 1g in 100 ml Lösung. Sie wurde mit destilliertem Wasser 1:4 verdünnt und in einer dunklen Flasche im Kühlschrank aufbewahrt.

Diese färbt verstärkt Polypeptide mit vielen basischen Resten (Lysin, Arginin) an. Die Proteinstandardlösung wurde durch Verdünnung einer 4 mg/ml BSA-Stammlösung hergestellt.

Materialien:

Spektralphotometer Cary UV 50 (Bio Varian)

Küvette Halb-Mikro (Greiner)

Pipettenspitzen

Reagenzien:

Bradfordlösung

Proteinstandardlösung

4.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Diese Form der Elektrophorese ist ein häufig angewandte Methode zur Trennung von Proteinengemischen und zur Bestimmung von Molekulargewichten der getrennten Proteine. Bei der SDS-PAGE wird das Proteingemisch vor der Trennung mit dem anionischen Detergenz SDS versetzt. Die meisten Proteine binden dieses Detergenz in einem konstanten Verhältnis, so dass SDS-beladene Proteine nahezu identische Ladung-Masse-Verhältnisse aufweisen. Die negative Ladung von SDS bedingt, dass die Eigenladung der Proteine maskiert wird, d.h. alle Proteine sind stark negativ geladen. Die SDS-Erhitzung bei ca. 95°C führt zur Denaturierung der

Materialien und Methoden

Proteine, die dann aufgrund des Siebeffekts des Gels nach ihren molaren Massen getrennt werden, wobei die kleinsten am schnellsten wandern. Bei der Zugabe von Mercaptoethanol werden die Disulfid-Brücken gespalten. Dies hat zur Folge, dass die Proteine einzeln in der SDS-PAGE laufen. Bei Jeder SDS-PAGE-Vorbereitung wurden die Glasscheiben gut mit Ethanol gesäubert. Dann wurde ein 9% Trenngel aus 1.13ml 40% Acrylamidlösung, 1.25ml Lower Tris (4x), 1ml 87% Glycerin, 1.62ml Aqua dest., 10µl 40% APS und 6µl TEMED hergestellt. Anschließend wurde ein Sammelgel aus 0.5 ml Acrylamidlösung, 1.25ml Upper Tris (4x), 3,2ml Aqua dest., 18µl 40%APS, 18µl TEMED hergestellt. APS und TEMED wurden zum Schluss immer zügig zur Verstärkung der Polymerisation von Acrylamid/Bisacrylamid gegeben und vor Ansatz des Sammelgels das Trenngel mit deionisiertem H₂O überschichtet, um dieses zu begradigen. Dann gab man jeweils eine Proteinmenge von ca. 20µg in die entsprechenden Eppendorf tubes und füllte diese mit dem Auftragspuffer auf 30µl auf. Danach wurde es auf 95°C erhitzt und in den Geltaschen mit einer Mikroliterpipette von links nach rechts geladen. In der ersten Geltasche wurde ein Marker eingesetzt. Die Proteine wurden dann mittels 1:10 verdünnten Runningpuffer zwei Stunden bei 130V getrennt. Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wanderten zur Anode, die sich am unteren Ende des Gels befandeten. Kurz bevor die Proteine das untere Ende des Gels erreicht hatten, wurde die Stromzufuhr unterbrochen und das Gel vorsichtig entnommen. Die Wanderungsgeschwindigkeit (V) eines Proteins im elektrischen Feld hängt von der elektrischen Feldstärke (E), der Nettoladung des Proteins (Z) und dem Reibungskoeffizienten (f) ab, $V = EZ/f$. Der elektrischen Kraft EZ, die das geladene Molekül zur entgegengesetzt geladenen Elektrode treibt, wirkt die Reibungskraft fV, die zwischen den wandernden Molekülen und dem Medium entsteht, entgegen. Der Reibungskoeffizient f hängt sowohl von Masse und Gestalt des wandernden Moleküls als auch von der Viskosität (n) des Mediums ab. Für eine Kugel mit Radius r gilt: $f = 6\eta nr$

Materialien:

Elektrophorese-Apparatur

Aufhitzer

Glassplatten

Reagenzien:

Acrylamidlösung (Gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 40%-ige Acrylamid

/Bisacrylamid- Stammlösung im Verhältnis 29:1) Ratiophorese Gel Carl Roth GmbH+Co

87% Glycerin (Roth)

40% APS (Roth)

Ethanol (Roth)

(4x) Lower Tris (36.34 g Tris und 0.8 g SDS werden in 150 ml Wasser gelöst. Dann mit 6 M HCl zum PH 8.8 titriert. Schließlich Wasser hinzugeben bis zum Gesamtvolumen von 200 ml).

(4x) Upper Tris (12.11 g Tris und 0.8 g SDS werden in 150 ml Wasser gelöst. Dann mit 6 M HCl zum PH 6.8 titriert. Schließlich Wasser hinzugeben bis zum Gesamtvolumen von 200 ml).

TEMED (0.5% für die Elektrophorese. Carl Roth GmbH+Co)

Aqua dest.

Auftragspuffer (62,5mM Tris HCl, 2%SDS, 20%Glycerin(87%), 5/1000 Bromphenolblau; 5%Beta-Mercaptoethanol).

Running Puffer (24mM Tris Base, 190mM Glycine, 0,1% SDS)

4.4.3 Blotten und Filmentwicklung

Es wurde zuerst das Sammel-Gel vom Trenn-Gel abgetrennt. Dann wurden eine PVDF-Membran und Filterpapier vor dem Gebrauch in Blot-Puffer getränkt. Anschließend wurde wie folgt sandwichähnlich übereinandergestapelt.

Oben: Deckel mit Kathode(-)

Pad-Filter

Filterpapier

Gel

PVDF-Blotmembran

Filterpapier

Padfilter

Unten: Platinelektrode; Anode(+)

Das Sandwich wurde in die Elektrodenkammer eingesetzt und der Blotpuffer dazugegossen bis die Kathode vollkommen getränkt wurde. Dann wurde für 45 min bei 150V geblottet. Danach wurde die PVDF-Blotmembran für ca. 5 min in einer Ponceau-rot-Färbelösung eingesetzt, um die geblotteten Proteine darzustellen. Dann wurde solange mit Leitungswasser gespült bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Membran wurde anschließend in NaOH für Ponceau

gewaschen, dann mit NET-g-Puffer gespült und in NET-g-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der erste Antikörper hinzugegeben (ein 1:1000 verdünnter Mouse Monoclonal Antibody to human HLA-G/1)(MEM-G/1) und für 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. MEM-G/1 reagiert mit freiem denaturiertem HLA-G, aber nicht mit nativem HLA-G auf der Zelloberfläche. Nach dieser Inkubationszeit wurde 5mal 3 min lang mit NET-g-Puffer auf dem Schüttelgerät bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der zweite Antikörper in einer 1:10000 Verdünnung hinzugegeben und für eine Stunde auf dem Schüttelgerät bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wiederum 5 mal 3 min mit NET-G-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde unter Lichtausschluss die Membran in eine eingeschweißte ECL-Lösung eingesetzt und der Film in der Dunkelkammer entwickelt.

4.4.4 Prinzip der ECL-Methode

Die Peroxidase Luminol oxidiert im alkalischen Milieu zu einem Luminol-Radikal, das einige Minuten lang Licht emittiert. Am Proteinantikörperkomplex bindet die Peroxidase und führt dort zur Filmschwärzung.

Westernblotmaterialien:

PVDF-Blotmembran (Amersham Pharmacia Biotech)

Filterpapiere

Elektrodekammer (Life Technology)

Schüttelgerät

Schweißgerät

Filmkassette (Kisker)

UV Film (Skeletal/RA 18x24cm Kodak)

Westernblotchemikalien:

Blotpuffer (1x 2l, 25 mM Tris (6.05g), 192 mM Glycin (28.8g), 20% Methanol (400 ml),

0,02% SDS (0,4g = 2ml(20% SDS))

ECL detection reagent (Cell Signaling Technology)

NET-G-Puffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0.05% Triton X-100, 0.25% Gelatine, PH 7.4)

Ponceau-Rot (Roth)

NaOH für ponceau

Erster Antikörper (MEM-G/1)

Zweiter Antikörper

Fixierer

Entwickler

4.5 Prinzip und Protokoll des Proliferationsassays

Die negative Kontrolle und die mit Oligonukleotiden transfizierten JEG-3 Zellen aus der 6 Well-Platte mussten zuerst mit HBSS gewaschen werden, dann mit einer geringeren Menge Trypsin atrypsiniert und im Brutschrank für 5 min inkubiert werden. Danach wurde in der 6 Well-Platte jeweils 1ml DMEM-Medium dazugegeben und vorsichtig geschüttelt. Dann wurden 10µl eines Zellmediumgemisches in eine Neubauer-Kammer zur Bestimmung der Zellkonzentration pipettiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Gesamtzellzahl der vier Quadranten in den Ecken der Neubauer-Kammer gezählt. Daraus wurde ein Mittelwert ermittelt und mit dem Konstanten Faktor 10^4 multipliziert. Ein Zellmediumgemisch-Volumen mit genau 100 000 Zellen musste in die 96 Well-Platte pipettiert werden. Sehr wichtig war dabei ein Endvolumen von 100µl pro well. Anschließend wurde im Brutschrank bei 35°C und 5% CO₂ bis zum nachfolgenden Tag inkubiert. Am nächsten Tag wurde jeweils 20µl Proliferationslösung in jedes Well zugegeben und jeweils nach zwei, drei und vier Stunden Inkubationszeit im Brutschrank die Proliferation mit einem Spektrophotometer UV 50 gemessen. Die CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay besteht aus zwei Bestandteilen: PES (Phenazine Ethosulfate) und MTS (Tetrazolium). PES kann mit Hilfe von MTS sowohl in als auch aus lebenden Zelle befördert werden. Sie fangen die reduzierten Äquivalente von Molekülen wie NADH. Die reduzierte PES wandert dann vom Zytoplasma von lebenden Zellen zum Kulturmedium und reduziert MTS zum löslichen intensiv gefärbten Formazan. Wird das Kulturmedium mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 490nm bestrahlt, dann absorbiert Formazan das Licht. Die Konzentration von Formazan ist direkt proportional zur lebenden Zellzahl in der Kulturlösung. Tote Zellen verlieren sehr schnell die Fähigkeit das Tetrazolium MTS zu Formazan zu reduzieren.

Materialien:

Pipettenspitzen

96 Well-platte

Brutschrank

Neubauer-Kammer

Mikroskop

Spektrophotometer UV 50

Reagenzien:

CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)

sHLA^G

Human IL-6 (Hölzel Diagnostika)

4.6 Prinzip und Protokoll des Apoptose-Assays (PARP-Assay)

Zwei Tage nach dem Knock Down und der Stimulation mit 200ng/ml IL-10 wurde zuerst das Kulturmedium aus der 6 Well-Platte abpipettiert und verworfen, dann wurden die Zellen abtrypsiniert und danach ca. 500µl DMEM-Medium hinzugegeben. Das Zellmediumgemisch wurde restlos aus der 6 Well-Platte entnommen und in Eppendorf Tubes gegeben. Anschließend wurde bei 1500 U/min für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dann wurde 1ml 2 prozentiges Formalin hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 10 bis 15 min inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit ca. 1ml HBSS gewaschen und bei 1500 U/min für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde 1ml eines 1:100 verdünnten Permeabilisatorpuffers hinzugefügt, dann vorsichtig geschüttelt und 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde noch einmal bei 1500 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden 50µl eines 1:100 verdünnten Permeabilisatorpuffers und 2,5µl PARP-Antikörper hinzugegeben und weiterhin für 15-30 min bei 4°C inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen mit ca. 150µl HBSS gewaschen und bei 1500 U/min für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 200µl HBSS wurde zu jeder Zellreihe hinzugegeben und bei 4°C und unter Lichtausschluss bis zur Analyse inkubiert. Die Analyse erfolgte im FACS-Gerät (Durchflusszytometer). Das Prinzip ist das Streulicht aufzufangen, das von Zellstrukturen wiedergespiegelt wird. Bei der Apoptose wird das 116 KDa schwere

Kernenzym PARP [Poly (ADP-ribose) Polymerase] durch die Caspasen in zwei Fragmente mit geringerer Aktivität gespalten: Ein 85 KDa und ein 29 KDa Fragment. PARP kann NAD-abhängig DNA-Schäden reparieren. Es kann aber auch über Entleerung des zellulären NAD-Pool zum Zelltod führen. Während dieses Apoptoseassay wurden Fluoreszenz-markierte PARP-Antikörper hinzugegeben, die speziell an das 85 KDa gespaltene PARP-Fragment binden. Im FACS-Gerät erscheinen dann Zellen mit gespaltenen PARP-Fragmenten und somit der Prozentsatz von apoptotischen Zellen.

Materialien:

10ml Pipetten und Pipettenspitzen

Eppendorf Tube

Inkubator

FACS-Gerät (FACS-Calibur, Becton Dickinson)

Zentrifuge

Reagenzien:

Trypsin

Formalin

Permeabilisationspuffer (1:100)

Anti-PARP-Antikörper

5 Ergebnisse

Um herauszufinden, ob das Signalmolekül HLA-G eine autokrine Wirkung auf Trophoblastzellen hat, wurde zuerst die Effizienz der zur RNA Interferenz angewendeten siRNA-Sequenzen mittels Western Blot geprüft. Anschließend wurde das Verhalten der Zellen mit verminderten HLA-G-Expression bezüglich ihrer Proliferation und Apoptose untersucht. Zum Schluss wurde der Einfluss von löslichen HLA-G und Zytokinen auf die Proliferation und Apoptose untersucht.

5.1 Ergebnisse der Western Blots

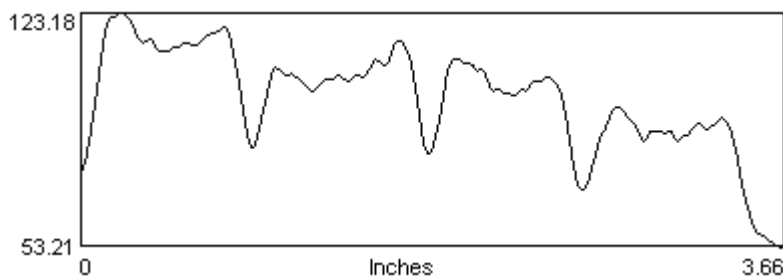
Diese Versuche wurden drei Mal wiederholt und es zeigten sich beim HLA-G-Blot jedes Mal ähnliche Ergebnisse.



HLA-G

neg. Kontr. siRNA-SCR siRNA-HLA-G siRNA-HLA-G1/5

Abb. 3: Repräsentatives Beispiel eines HLA-G-Western Blots nach „Silencing“ der gesamt-HLA-G- und HLA-G1/5-Expression mittels siRNA. SiRNA-SCR ist eine nicht genomische Kontroll-siRNA



HLA-G

Abb. 4: Densitometrische Darstellung des oben abgebildeten HLA-G-Western Blotes. Die y-Achse zeigt die relative Dichte.

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen sowohl den Film aus dem Western Blot als auch die graphische Darstellung der aufgetragenen HLA-G-Proteinen. In der ersten Reihe dieser Abbildungen sind HLA-G-Proteine von negativen Kontrollen aufgetragen worden: d.h. HLA-G-Proteine von nicht transfizierten Zellen. In der zweiten Reihe wurden HLA-G-Proteine von Kontrollen aufgetragen, die mit nicht-genomischer siRNA transfiziert wurden. In den beiden letzten Reihen wurden jeweils Lysate von JEG-3-Zellen aufgetragen, die mit siRNA für gesamt-HLA-G und HLA-G1/5 transfiziert wurden. Wenn man sich auf die negative Kontrolle bezieht, stellt man fest, dass es bei jeder Transfektion mit siRNA-HLA-G zu einer unterschiedlichen Abnahme der HLA-G-Expression kommt. Die deutlichste Abnahme der Expression von HLA-G-Molekülen kann man auf dem Film bei der Transfektion von JEG-3 Zellen mit siRNA-HLA-G1/5 beobachten. Beim Vergleich mit der in der Abbildung 4 dargestellten Graphik, wo die Schwärzung des Filmes quantifiziert wurde, stellt man fest, dass es keinen relevanten Unterschied zwischen siRNA für HLA-G und HLA-G1/5 gibt.

5.2 Ergebnisse des Proliferationsassays

Der Versuch wurden aus den gleichen vier Zell-Ansätzen wie beim Western Blot durchgeführt: d.h aus negativen Kontrollen, nicht-genomischer siRNA-Kontrollen, sowie mit siRNA-HLA-G und siRNA-HLA-G1/5 transfizierten Zellen. Sie wurden in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe blieb unstimuliert, die andere wurde mit 0,16µl/ml löslichem HLA-G, 200ng/ml IL-6 und die Kombination aus löslichem HLA-G und IL-6 stimuliert. Es wurden vier Proben von jeder Zelllinie in die 96 Well-Platte gegeben. Mit den unstimulierten Zellen und den mit IL-6 stimulierten Zellen wurden jeweils fünf Versuche durchgeführt. Mit den mit löslichem HLA-G stimulierten Zellen und den mit löslichem HLA-G und IL-6 stimulierten Zellen wurden jeweils drei Versuche durchgeführt. Ein Mittelwert wurde aus den einzelnen Daten des Proliferationsassays nach zwei, drei und vier Stunden gebildet.

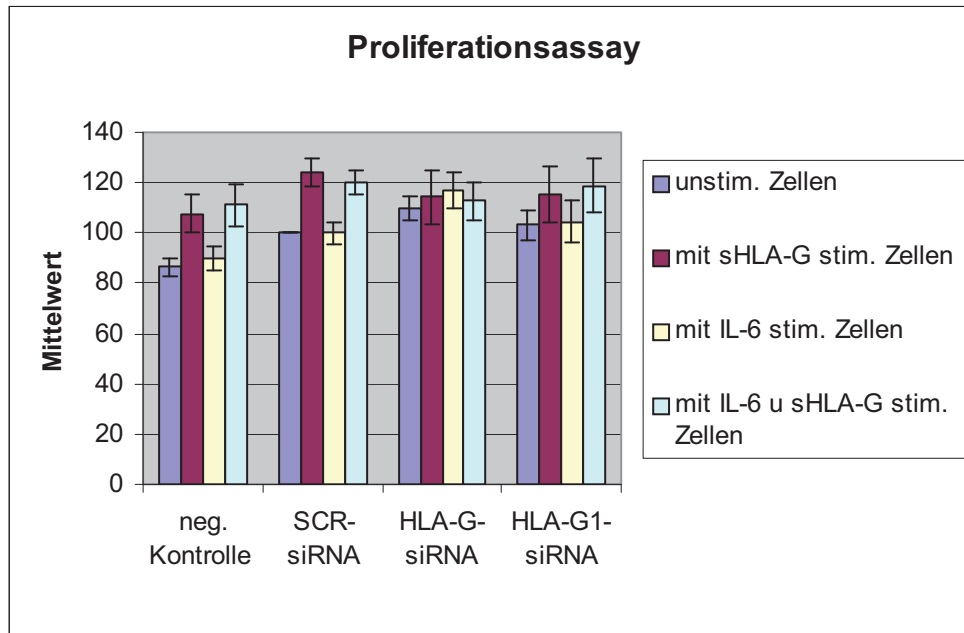


Abb. 5: Mittelwert des Proliferationsassays aus unstimulierten und mit sHLA-G und IL-6 stimulierten JEG-3-Transfektanten. -SCR-siRNA ist eine nicht-genomische Kontroll siRNA. Die relative Proliferation der unstimulierten mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wurde als 100 definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts. n= 5 unabhängige Versuche im Quadruplets.

Bei unstimulierten Zellen beobachtet man im Vergleich mit der negativen Kontrolle eine Steigerung der Proliferation bei allen transfizierten Zellen: sowohl bei nicht-genomischer siRNA-Kontrolle als auch bei HLA-G-siRNA-Transfektanten. Die Proliferation bei den HLA-G-siRNA-Transfektanten ist jedoch höher als die der siRNA-Kontrolle. Am stärksten ist die Proliferation bei HLA-G-siRNA-Transfektanten. Die Behandlung von negativen Kontrollen und transfizierten JEG-3 Zellen mit löslichem HLA-G, IL-6 und der Kombination aus sHLA-G und IL-6 führt zu einer Zunahme der Proliferation. Während IL-6 nur einen geringen proliferativen Einfluss auf HLA-G-siRNA-Transfektanten zeigt, weisen lösliches HLA-G und die kombinierte Stimulation aus löslichem HLA-G und IL-6 die größten proliferativen Wirkungen auf alle Zelllinien.

Da der Median die Verteilung der Werte besser als der Mittelwert beschreibt, wurde dann zum Vergleich das nachfolgende Diagramm (Abb. 5) angefertigt. Es zeigen sich tendenziell ähnliche

Werte wie beim Mittelwert. Dies bedeutet, dass die Messwerte wenige extreme Ausreißer enthalten und somit relativ dicht beieinander liegen.

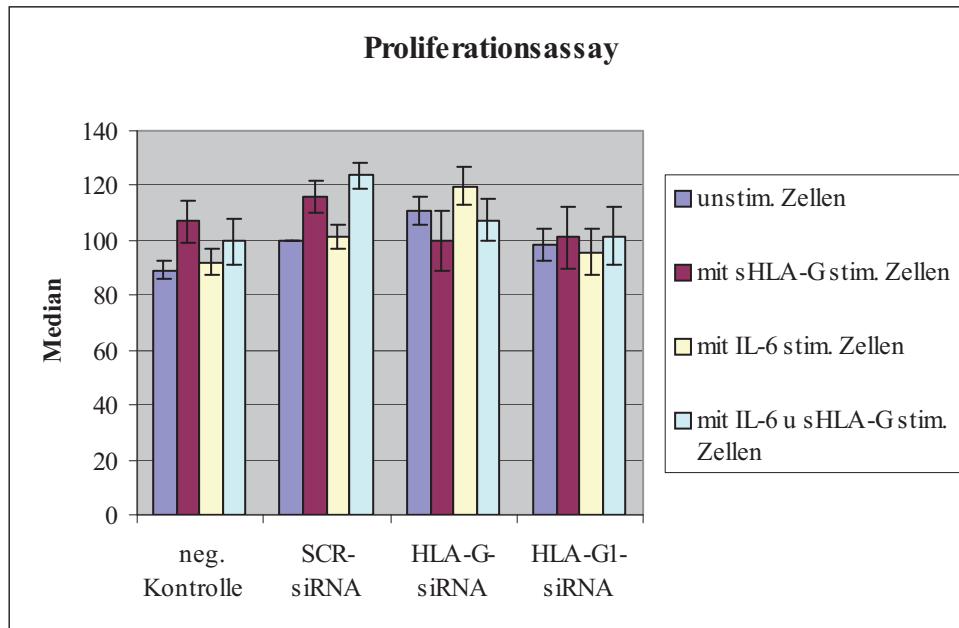


Abb. 6: Median des Proliferationsassays aus unstimulierten und mit sHLA-G und IL-6 stimulierten JEG-3-Transfektanten. -SCR-siRNA ist eine nicht-genomische Kontroll siRNA. Die relative Proliferation der unstimulierten mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wurde als 100 definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts. n= 5 unabhängige Versuche im Quadruplets.

5.3 Ergebnisse der Apoptose-Assays (PARP-Assay)

Die JEG-3 Zellen wurden in zwei Gruppen unterteilt: unstimulierte und mit 200ng/ml IL-10 stimulierten Zellen. Die Zellen waren entweder unbehandelt, Negativ-kontrolle, mit nicht-genomischer siRNA oder den verschiedenen HLA-G-siRNA-Sequenzen tranfiziert. In der Abbildung 6 ist der Prozentsatz von abgespaltenen PARP und somit der Prozentsatz von Zellen, die die Apoptose durchlaufen haben angegeben. Man stellt fest, dass die Transfektion von JEG-3 Zellen zu einer leichten relativen Zunahme der Apoptose führt. Die Stimulierung der Zellen mit IL-10 führt zu einer Abnahme der Apoptose bei der nicht-genomischen siRNA-Kontrolle und bei

Ergebnisse

siRNA-HLA-G1-Transfektanten, während sie bei der Negativ-Kontrolle und siRNA-HLA-G-Transfektanten zu einer Zunahme der Apoptose führt.

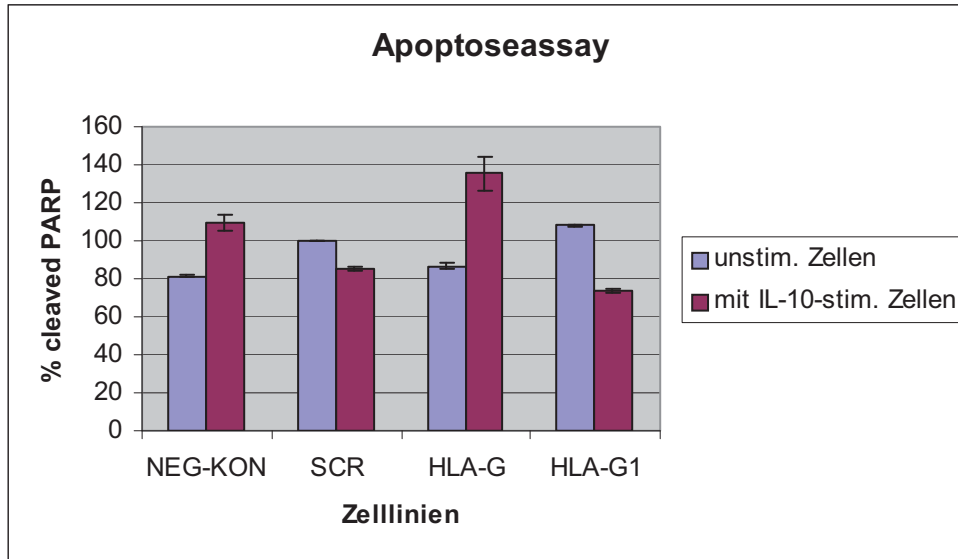


Abb. 8: Ergebnisse des Apoptoseassays aus unstimulierten und mit IL-10 stimulierten JEG-3-Transfektanten und negativen Kontrollen. -SCR-siRNA ist eine nicht-genomische Kontroll siRNA. Die relative Apoptoserate der unstimulierten mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wurde als 100 definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts. n= 5 unabhängige Versuche im Quadruplets.

6 Diskussion

6.1 Einfluss der siRNA auf die HLA-G-Expression

Die Expression des nicht polymorphen MHC-Moleküls HLA-G kann durch die HLA-G siRNA-Transfektion reduziert werden. Diese Methode wurde bereits in einigen früheren Studien an trophoblastären Zellen angewendet. (Sun L.L. et al., 2008; Chen J.H., 2007; Chen C.L. et al., 2005; Wengenmayer T et al., 2004). In den Western Blots war eine deutliche Abnahme der Expression des gesamt-HLA-G bei der Transfektion mit siRNA-HLA-G1 zu beobachten. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass vermehrt HLA-G1 im Vergleich zu anderen HLA-G-Isoformen exprimiert wird. Blaschitz A. et al. konnten 2005 beweisen, dass das hauptsächlich sezernierte lösliche HLA-G in Trophoblastzellen HLA-G1-Molekül ist, das kürzer als HLA-G5 (das vermeintliche sHLA-G1) ist und kein Intron 4 enthält. Man vermutet, dass HLA-G1 von Metalloproteinasen abgespalten wird (Park GM. et al., 2004). Die Intron 4 enthaltenden löslichen HLA-G5 und HLA-G6 wurden nur in extrem niedrigen Spiegel nachgewiesen. Paul P. et al. konnten 2000 zwar HLA-G7 als eine neue gespleißte Form der HLA-G mRNA identifizieren, aber es fand sich nur schwach im Western Blot und in der Immunopräzipitation im Vergleich zum löslichen HLA-G 5. Was HLA-G2, -G3, und G4-Isoformen betrifft, wurden sie bisher aufgrund des Mangels an spezifischen Antikörpern nicht ausreichend untersucht. Mallet V. et al. beschrieben 2000, dass nur HLA-G1 auf die Zelloberfläche exprimiert wird, während HLA-G2, -G3, und G4-Isoformen im ER. Verbleiben, wo sie eine Rolle bei der Zelloberflächeexpression von HLA-G1 und HLA-E spielen. Riteau B. et al. widersprachen 2001 diesen Ergebnissen, indem sie nachweisen konnten, dass HLA-G2, -G3, und G4-Isoforme tatsächlich auf der Oberfläche von transfizierten Zellen exprimiert werden und ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die lytische Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten und peripheren NK-Zellen haben. Somit wären diese besonders wichtig z.B. im Fall einer Veränderung von HLA-G1 durch Mutation, indem sie das verlorene HLA-G1 ersetzen und damit die Immuntoleranz aufrechterhalten würden. Wenn man aber bedenkt, dass siRNA-HLA-G eigentlich gegen alle mRNA-HLA-G-Isoformen wirken soll, müsste man im Western Blot theoretisch bei siRNA-HLA-G-Transfektanten die stärkste HLA-G-Expressionshemmung erwarten. Dies ist aber in allen durchgeführten Versuchen nicht der Fall. siRNA-SCR („scrambled“) ist eine nicht-

genomische Oligonukleotidssequenz von 21 bp., die mit keinen bekannten menschlichen Proteine interagieren kann (Wengenmayer T et al., 2004). Damit wäre zu erwarten, dass sich die Ergebnisse der Negativ-Kontrolle nicht von denen der nicht-genomischen Kontrolle unterscheiden. Das HLA-G-Western Blot zeigte auch eine leichte relative Abnahme der Expression von HLA-G bei der nicht-genomischen Kontrolle im Vergleich mit der negativen Kontrolle. Die wiederholten Kultivierungen, Transfektionen und HLA-G-Western Blots ergaben jeweils ähnliche Ergebnisse.

6.2 Schutz vor dem Immunsystem durch die HLA-G-Expression

HLA-G wird hauptsächlich von EVT exprimiert und hat somit eine stark begrenzte Gewebsverteilung unter nicht pathologischen Bedingungen. Onno et al konnten 1994 die Expression von HLA-G in vielen anderen Organen und Geweben nachweisen. Bei pathologischen Prozessen wie bei inflammatorischen Erkrankungen (Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn, Rheumatoide Arthritis, SLE), Multipler Sklerose, Tumoren, HIV-Infektionen kommt es zu einer stärkeren HLA-G-Expression in den befallenen Geweben im Vergleich zu nicht befallenen Geweben [Wiendl H. et al., 2005; Torres MI. et al., 2004; Rizzo R. et al., 2006 u 2008;]. Dies lässt an einen Schutz von pathologischen Zellen vor dem Immunsystem vermuten. Was HIV-Infektion betrifft, veröffentlichten 2004 Derrien M. et al., dass die akute HIV-1-Infektion die Zelloberflächenexpression von membrangebundenen HLA-G1-Molekülen downreguliert, aber die Zellen, die eine HIV-Infektion überstanden haben, zeigen eine gesteigerte HLA-G1-Expression. Viele andere Studien bestätigen die vermehrte Expression von HLA-G, insbesondere sHLA-G, bei HIV-Infizierten (Lajoie J. et al., 2009; Donaghy L. et al., 2007). Sun LL. et al. konnten 2008 nachweisen, dass die HLA-G-Down-Regulation in JEG-3 Zellen mittels siRNA-HLA-G zu einer Zytolyse dieser JEG-3 Zellen durch NK-Zellen führt. Somit schützen HLA-G Trophoblastzellen vor dem Eingriff des Immunsystems. Dies weist die Toleranz des mütterlichen Immunsystems gegen den semiallogenen Fetus nach.

6.3 Proliferation durch Transfektion von JEG-3 Zellen mit siRNA-HLA-G/1

Ein bemerkenswertes Ergebnis dieser Arbeit ist die Feststellung, dass die Behandlung von JEG-3 Zellen mit siRNA-HLA-G/1 zur gesteigerten Proliferation dieser Zellen führt. JEG-3 Zellen

produzieren genauso wie normale Trophoblastzellen außer MHC-Proteinen viele Peptide und Hormone (Ni X. et al., 2000). Als Peptide werden z.B. Activin β A (ein Mitglied der TFG- β), Inhibin β , Follistatin exprimiert. Beispiele für Hormone sind hCG und Steroidhormone wie GnRH, Progesterone und Östrogene. Während Activin β A an Activinrezeptoren auf JEG-3 Zellen binden können und dadurch möglicherweise über die Activin-Signaltransduktionskaskade (Smad-2 und Smad-4) die Steroidproduktion steigern, hemmen Follistatin durch Bindung an Activinrezeptoren die Steroidproduktion (Ni X. et al., 2000). Es konnten aber keinen Einfluss von Activin A und Follistatin auf die Proliferation von JEG-3 Zellen beobachtet werden. HCG stimuliert zwar die Migration und Invasion von JEG-3 Zellen, hat aber keinen Einfluss auf die Proliferation dieser Zellen (Zygmunt M. et al. 1998). Ich schlage vor, dass der von uns beobachtete proliferative Effekt entweder durch den Stress der siRNA-Transfektion auf die JEG-3 Zellen verursacht wurde oder durch Kompensationsmechanismus als Folge abnehmender Expression von HLA-G entstanden ist. Was den Stress betrifft, gemeint ist nicht der oxidative Stress, der eigentlich zur Schädigung der Zelle führen würde, sondern ein positiver Stress, der die Zellen zur Vermehrung anregt. Dabei könnten glykolytische Enzyme eine Rolle spielen. Durch den vermehrten enzymatischen Abbau von Glykose könnte vermehrt ATP gebildet werden, welches die Zellteilung stimulieren würde. Wenn es sich um ein Kompensationsmechanismus handelt, müsste es dann wie folgt erklärt werden: das Bestreben von JEG-3 Zellen, die verminderte Expression von HLA-G-Molekülen mit der Zellproliferation auszugleichen. Diese versuchen damit einen eventuellen nächstmöglichen Angriff durch Immunzellen abzuwehren. Mit anderen Worten Sie tun alles, um ihr Leben zu retten. Wenn man aber bedenkt, dass die Versuche ohne Einfluss von Immunzellen erfolgten, ist es selbstverständlich, dass die JEG-3 Zellen trotz verminderten HLA-G-Expression nicht absterben. Chen CL. et al. konnten aber 2005 zeigen, dass durch die Downregulation der HLA-G-Expression mittels siRNA-HLA-G das Wachstum von Chorionkarzinomzellen gehemmt wurde. Interessanterweise zeigte sich bei meiner Arbeit die größte proliferative Wirkung, wenn die JEG-3 Zellen mit siRNA-HLA-G, also siRNA gegen allen HLA-G-Isoformen transfiziert wurde. Wie wäre dann das vermutete Kompensationsmechanismus am besten zu begründen? Ich nehme an, dass HLA-G (sowohl membrangebundenes als auch lösliches HLA-G) autokrin auf die JEG-3 Zellen wirkt und möglicherweise entweder über einen noch nicht bekannten HLA-G-Rezeptor auf JEG-3 Zellen oder direkt an Zytokinrezeptoren die Zytokinproduktion an JEG-3 Zellen stimuliert und damit eine HLA-G- bzw. eine Zytokinsignaltransduktionskaskade auslöst, mit der Folge des

Zellwachstums. Es wurde aber bislang in der Literatur noch nicht über einen eventuellen HLA-G-Rezeptor auf Trophoblastzellen bzw. JEG-3 Zellen berichtet. Während die Choriokarzinomzellen JAR, BeWo und JEG-3 entweder gar keine oder nur geringere Mengen von IL-1, TNF-alpha und INF-gamma exprimieren, produzieren Term-Trophoblasten ausreichend IL-6, IL-10, IFN-alpha, IFN-beta, und granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) (Bennett WA. et al., 1996). Die JEG-3 Zellen produzieren zwar entweder keine oder nur geringere Mengen an Zytokinen, besitzen aber sehr hohe Konzentrationen an Zytokinrezeptoren. Außerdem exprimieren menschliche Trophoblastzellen im ersten Trimenon stark das Chemokin CXCR6, das auf autokrinen Weg die Trophoblastproliferation und Invasion stimuliert (Huang Y. et al., 2006).

6.4 Einfluss von löslichem HLA-G und IL-6 auf die Proliferation von nicht- und transfizierten JEG-3 Zellen

Es wurde bei dieser Arbeit nachgewiesen, dass lösliches HLA-G und IL-6 die Proliferation von JEG-3 Zellen stimulieren. Das pro- und anti-inflammatorisch wirkende Zytokin IL-6 kann überwiegend über den Jak/STAT3-Signaltransduktionsweg, aber auch über den SHP2/Ras/Raf/ERK1/2/MAPK-Signaltransduktionsweg das Wachstum bzw. die Proliferation, die Differenzierung, die Invasion, die Migration und die Apoptose von Zellen beeinflussen (Hirano T. et al. 2000; Fitzgerald JS. et al. 2005; Dubinsky V. et al. 2010). IL-6 wird außerdem von Trophoblastzellen exprimiert, womit eine autokrine Wirkung angenommen wird (Bennett WA. et al., 1996; Kong B., et al. 1996).

Lösliches HLA-G zeigte eine deutliche proliferative Wirkung auf alle unterschiedlich behandelten Zellen (mit unbeeinflusster oder reduzierter HLA-G-Produktion). Wie kommt es zu diesem Effekt? Möglicherweise interagiert lösliches HLA-G, wie schon oben erwähnt, mit einem noch unbekannten HLA-G-Rezeptor auf Trophoblast- bzw. JEG-3 Zellen oder sogar kompetitiv mit einem Zytokinrezeptor und löst damit eine Signaltransduktionskaskade, die dann zur Proliferation führt. Es sind aber bislang keine Studien mit einem eventuellen HLA-G-Rezeptor auf Trophoblast- bzw. JEG-3 Zellen publiziert worden. Somit müsste lösliches HLA-G mit einem anderen Rezeptor interagieren, um das Proliferationsverhalten dieser Zellen beeinflussen zu können. Zytokinrezeptoren kommen zahlreich auf JEG-3- und Trophoblastzellen vor. Die gesteigerte Proliferationswirkung von löslichem HLA-G könnte höchstwahrscheinlich

mit der Interaktion von sHLA-G und Zytokinrezeptoren erklärt werden. Die kombinierte Stimulation der transfizierten JEG-3 Zellen mit sHLA-G und IL-6 führte nur zu einer leichten Steigerung der Proliferation im Vergleich zu den ausschließlich mit sHLA-G stimulierten JEG-3-Transfektanten. McCormick J. et al konnten 2009 in einer Studie die regulierende Wirkung von löslichem HLA-G auf Migration und Invasion von SGHPL-4 publizieren, wenn die vom Trophoblast abstammenden SGHPL-4 Zelllinie mit Wachstumsfaktoren wie hepatocyte growth factor (HGF) or epidermal growth factor (EGF) behandelt wurden. Trotz der Vermutung der HLA-G-vermittelten Zytokinproduktion und damit einer Schlüsselfunktion in der Implantation durch Trophoblastinvasion,-Migration und Proliferation (Kanai T. et al., 2001 und 2003; Roussev RG. et al., 2007) muss noch untersucht werden, durch welche Wege sHLA-G zu einer Zytokinproduktion bzw. zur Proliferation führt. Schon nachgewiesen worden ist aber die Tatsache, dass Zytokine von Term-Trophoblastzellen produziert werden (Bennett WA. et al., 1996).

6.5 Die siRNA-Transfektion von JEG-3 Zellen führt zu einer leichten Zunahme der Apoptose

Die siRNA-Transfektion von JEG-3 Zellen führt zu einer leichten Zunahme des Prozentsatzes von abgespaltetem PARP [Poly (ADP-ribose) Polymerase] und somit des Prozentsatzes von Zellen, welche die Apoptose durchlaufen haben. Dies spiegelt wahrscheinlich die autokrine Wirkung von HLA-G im Überleben von JEG-3 Zellen wieder. Die schützende Wirkung von HLA-G vor der Apoptose der JEG-3 Zellen wurde bisher noch nicht ausreichend untersucht. Liu HY. et al. konnten 2008 beweisen, dass das Verhältnis von früher Apoptose in transfizierten JEG-3 Zellpopulation im Vergleich mit der negativen Kontrolle signifikant erhöht war. Es muss noch untersucht werden, durch welche intrazellulären Signaltransduktionswege HLA-G-Moleküle die Apoptose in JEG-3 hemmen. Man weiß aber, dass die Caspasen das 116 KDa schwere Kernenzym PARP, dessen Rolle die NAD- abhängige Reparatur der DNA-Schäden ist, in zwei Fragmente mit geringeren Aktivitäten spaltet: Ein 85 KDa und ein 29 KDa Fragment. Dabei verliert PARP seine Reparaturfähigkeit der DNA-Schäden und somit wird die Apoptose eingeleitet. Ein anderes wichtiges Element der Apoptose ist das p53. Schuler M. und Green DR. beschrieben 2001 zwei Wege, durch welche das p53 die Caspase-Aktivierung einleiten und damit die Apoptose induzieren können. Erstens kann p53 transkriptionell und nicht-transkriptionell die

Membranexpression von Death Rezeptoren wie TNF-R., CD95, Fas, APO-1 und TRAIL regulieren. Durch die Bindung von entsprechenden Liganden an diesen Rezeptoren kommt es zur Bildung von DISC (death inducing signalling complex), der wiederum die Caspasen aktiviert mit der Folge der Apoptose. Zweitens können p53 die Caspasen über alternative Wege aktivieren, also über mitochondriale apoptotische Faktoren wie cytochrome *c*, Smac/DIABLO und eventuell ROS (reactive oxygen species). Die Freisetzung dieser apoptotischen Faktoren aus dem Mitochondrium soll durch das pro- und antiapoptotische Bcl-2 reguliert werden. Sowohl JEG-3 als auch Term-Trophoblastzellen exprimieren die Protoonkogene p53 und Bcl-2 (Sakuragi N. et al., 1994). Tai JD. et al. konnten 2009 zeigen, dass die Downregulation von c-Myc und VEGF auf menschlichen Kolorektalkarzinomzellen mittels siRNA die Apoptose dieser Zellen stimuliert. Pérez-Pérez A. et al. bewiesen 2008, dass Leptin die Apoptose von JEG-3 und Trophoblastzellen über die Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionsweges verhindert. Besteht eine Interaktion zwischen HLA-G und den die Apoptose induzierende bzw. hemmende Rezeptoren an der JEG-3-Oberfläche wie z.B. der Leptin-Rezeptor? Hier sind noch weitere Studien erforderlich.

6.6 Einfluss von IL-10 auf die Apoptose

Die Behandlung von JEG-3 Zelllinien mit dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 führte zu widersprüchlichen Ergebnissen: zu einer Abnahme der Apoptose bei der nicht-genomischen siRNA-Kontrolle und bei siRNA-HLA-G1-Transfektanten, sowie zu einer Zunahme der Apoptose bei der negativen Kontrolle und siRNA-HLA-G-Transfektanten. Nachvollziehbar ist an Hand von Studien die Apoptosehemmung durch die IL-10-Behandlung. Viele Studien bewiesen schon die hemmende Wirkung von IL-10 auf die Apoptose in ischämischen Neuronen, in Lungentumorzelllinien, in Hepatozyten und in Herzmuskelzellen von Mäusen (Santiago-Lomeli M. et al., 2005; Liu N. et al., 2007; Dhingra S. et al., 2007 und 2009; de Bilbao F. et al., 2009; Kumagai K. et al., 2009; Zeng L. et al., 2010). Es wird vermutet, dass IL-10 die FasL und Caspase-3-Aktivierung hemmt (Zhong J. et al., 2006; Liu N. et al., 2007; Dhingra S. et al., 2007 und 2009). IL-10 soll z.B. in Kardiomyozyten über die Aktivierung des ERK 1/2 /MAPK-Signalweges die IKK-Phosphorylierung (inhibitor of kappaB kinase) hemmen und damit auch die TNF-alpha-induzierte NF-kappaB-Aktivierung von Caspase-3 (Dhingra S. et al., 2007 und 2009). Die Signaltransduktionskaskade, durch die IL-10 die Apoptose bei transfizierten JEG-3 Zellen

auslöst, muss noch weiter untersucht werden. Die Ursache für eine Zunahme der Apoptose bei JEG-3 Zellen, die anders behandelt wurden, bleibt weiterhin unklar

6.7 Einfluss von HLA-G siRNA-Transfektion auf die Invasion von JEG-3

Der Einfluss der HLA-G siRNA-Transfektion auf die Invasion konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Es gibt auch kaum publizierte Studien über das Thema. Nichtsdestotrotz konnten Liu HY. et al. schon 2008 eine reduzierte Invasion von JEG-3 Zellen mit reduzierter HLA-G-Expression im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontroll-JEG-3 Zellen feststellen. Deshalb wird angenommen, dass HLA-G auch eine wichtige Rolle in der Regulierung der Trophoblastinvasion spielen. Wie diese Regulierung abläuft, muss noch genau untersucht werden.

7 Zusammenfassung

Das nicht-klassische MHC-Klasse-Ib-Molekül HLA-G spielt nicht nur in der Plazenta, sondern auch bei zahlreichen pathologischen Prozessen wie bei inflammatorischen Erkrankungen, Tumoren, Infektionen etc. eine immunologische und nicht-immunologische Rolle. In der Plazenta spielt HLA-G eine wichtige Rolle für die Immuntoleranz des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem semiallogenen Fetus. Dabei interagiert HLA-G mit Rezeptoren auf verschiedenen mütterlichen Immunzellen, wie z.B. uterinen NK-Zellen (uNK), T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Dendritischen Zellen etc. und moduliert die Aktivität dieser Immunzellen. HLA-G kann auch über Up-Regulation der FasL-Expression die Apoptose in uNK-Zellen und T-Lymphozyten induzieren. Nicht zuletzt stimuliert HLA-G die Zytokinproduktion und trägt damit zu einer erfolgreichen Implantation bei.

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob das Signalmolekül HLA-G, das hauptsächlich von extravillösen Trophoblastzellen exprimiert wird, autokrin auf die Trophoblastzellen zurückwirkt. Es sollte diesbezüglich das Verhalten dieser Zellen hinsichtlich der Proliferation und Apoptose untersucht werden, wenn HLA-G mittels siRNA reduziert wurde und wenn die Zellen mit den Zytokinen IL-6 und IL-10 sowie mit löslichem HLA-G stimuliert wurden.

Es wurde mit der menschlichen Choriokarzinom-Zelllinie JEG-3 als Modell für Cytotrophoblastzellen gearbeitet. Diese wurden zuerst mit siRNAs transfiziert und nach zwei Tagen ein Western Blot angefertigt. Außerdem wurde in HLA-G-exprimierenden und HLA-G-reduzierten JEG-3 Zellen die Proliferation von unstimulierten sowie die Proliferation nach Stimulation mit IL-6 und löslichen HLA-G mittels CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay gemessen. Schließlich wurde die Apoptose mittels eines Apoptoseassays, der auf dem Nachweis von PARP [Poly (ADP-ribose) Polymerase]-Spaltung basiert, bei unstimulierten JEG-3 Zellen und bei mit IL-10 stimulierten JEG-3 Zellen bestimmt. Die abgespaltenen PARP-Fragmente wurden durchflusszytometrisch gemessen.

Als Ergebnisse konnte zunächst eine Abnahme der Expression von HLA-G durch die HLA-G siRNA-Transfektion mittels Western Blot gezeigt werden. Außerdem führte die HLA-G siRNA-Transfektion zu einer Steigerung der JEG-3-Proliferation.

Darüberhinaus stimulierten sowohl lösliches HLA-G als auch IL-6 die Proliferation von

HLA-G-siRNA-transfizierten und nicht transfizierten JEG-3 Zellen. Schließlich führte die siRNA-Transfektion von JEG-3 Zellen zu einer leichten Zunahme der Apoptose und die IL-10 Behandlung der nicht-genomischen-Kontrolle und der siRNA-HLA-G1-Transfektanten führt zu einer Abnahme der Apoptose. Die Recherche über den Einfluss von HLA-G siRNA-Transfektion auf die Invasion von JEG-3 brachte das Ergebnis einer reduzierten Invasion von transfizierten JEG-3 Zellen in Vergleich zu nicht transfizierten Kontroll-JEG-3 Zellen. So kann man schlussfolgern, dass HLA-G auf autokrinem Weg sowohl die Proliferation als auch die Apoptose und die Invasion regulieren. Der genaue Mechanismus, durch den HLA-G diese Veränderungen verursacht, muss aber noch näher untersucht werden. Vermutlich interagieren HLA-G mit Rezeptoren auf trophoblastären Zellen, wie z.B Zytokinrezeptoren und lösen dort kompetitiv eine Signaltransduktionskaskade aus, die dann zur Proliferationsteigerung, Apoptoschemmung und zur Invasionshemmung führt.

8 **Literaturverzeichnis**

1. Bahri R., Hirsch F., Josse A., Rouas-Freiss N., Bidere N., Vasquez A., Carosella ED., Charpentier B., Durrbach A. (2006) **Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes.** J Immunol. **176(3)**:1331-9.
2. Bai X., Williams JL., Greenwood SL., Baker PN., Aplin JD., Crocker IP. (2009) **A placental protective role for trophoblast-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL).** Placenta. **30(10)**:855-60.
3. Beer AE. and Billingham RE. (1970) **Implantation, Transplantation, and epithelialmesenchymal relationships in the rat uterus,** J. Exp. Med. 132, pp. 721-736.
4. Benjamin Lewin, **Molekularbiologie der Gene**, aus dem Englischen übersetzt von Kurt Beginnen, Beate Bettenhausen, Stefan Hartung, Julia Karow, Lothar Seidler, Jorunn Wissmann und Maria Yiallourou. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg . Berlin
5. Bennett WA., Lagoo-Deenadayalan S., Brackin MN., Hale E., Cowan BD. (1996) **Cytokine expression by models of human trophoblast as assessed by a semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction technique.** Am J Reprod Immunol. **36(5)**:285-94.
6. Bennett WA., Lagoo-Deenadayalan S., Whitworth NS., Brackin MN., Hale E., Cowan BD. (1997) **Expression and production of interleukin-10 by human trophoblast: relationship to pregnancy immunotolerance.** Early Pregnancy. **3(3)**:190-8.
7. Blaschitz A., Juch H., Volz A., Hutter H., Daxboeck C., Desoye G., Dohr G. (2005) **The soluble pool of HLA-G produced by human trophoblasts does not include detectable levels of the intron 4-containing HLA-G5 and HLA-G6 isoforms.** Mol Hum Reprod. **11(10)**:699-710.
8. Bowen JM., Chamley L. Keelan JA., Mitchell MD. (2002) **Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition.** Placenta. **23(4)**:257-73.
9. Bowen JM., Chamley L., Mitchell MD., Keelan JA. (2002) **Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women.** Placenta. **23(4)**:239-56.
10. Briscoe J., Kohlhuber F., Müller M. (1996) **JAKs and STATs branch out.** Trends Cell

- Biol. **6(9)**:336-40.
11. Bromberg J., Damell JE. Jr. (2000) **The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function.** Oncogene. **19(21)**:2468-73.
 12. Bulmer J.N., Johnson P.M. (1984) **Macrophage populations in the human placenta and amniochorion.** Clin. Exp. Immunol. **57(2)**:393-403.
 13. Cadet P., Rady PL., Tying SK., Yandell RB., Hughes TK. (1995) **Interleukin-10 messenger ribonucleic acid in human placenta: implications of a role for interleukin-10 in fetal allograft protection.** Am J Obstet Gynecol. **173(1)**:25-9.
 14. Challis JR., Lockwood CJ., Myatt L., Norman JE., Strauss JF. 3rd., Petraglia F. (2009) **Inflammation and pregnancy.** Reprod Sci. **16(2)**:206-15.
 15. Chaouat G., Clark DA. (2001) **FAS/FAS ligand interaction at the placental interface is not required for the success of allogeneic pregnancy in anti-paternal MHC preimmunized mice.** Am J Reprod Immunol. **45(2)**:108-15.
 16. Chen CL., Liao QP. (2005) **Role of human leukocyte antigen-G small interference RNA in a choriocarcinoma cell line.** Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. **40(8)**:549-52.
 17. Chen E., Gadina M., Chen M., O'Shea JJ. (1999) **Advances in cytokine signaling: the role of Jaks and STATs.** Transplant Proc. **31(3)**:1482-7.
 18. Chen JH., Yao YQ., Hou KB., Lei YF., Yin W. (2007) **Construction of eukaryotic expression plasmid expressing siRNA targeting HLA-G gene and detection of its specific downregulation effect.** Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. **23(5)**:409-12.
 19. Chumbley G., King A., Holmes N., Loke Y.W. (1993) **in situ hybridization and northern blot demonstration of HLA-G mRNA in human trophoblast populations by locus-specific oligonucleotide.** Hum. Immunol. **37**:17-22.
 20. Cody A. Koch, Jeffrey L. Platt. (2007) **T cell recognition and immunity in the fetus and mother.** Cell. Imm. 05.006.
 21. Cresswell P., Ackerman A.L., Giodini A., Peaper D.R., Wearsch P.A. (2005) **Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation.** Immunol. Rev. **207**:145-57.
 22. Cresswell P., Bangia N., DickT., Diedrich G. (1999) **The nature of the MHC class I peptide loading complex.** Immunol. Rev. **172**:21-8.
 23. Croker BA., Kiu H., Nicholson SE. (2008) **SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway.** Semin Cell Dev Biol. **19(4)**:414-22.

24. de Bilbao F., Arsenijevic D., Moll T., Garcia-Gabay I., Vallet P., Langhans W., Giannakopoulos P. (2009) **In vivo over-expression of interleukin-10 increases resistance to focal brain ischemia in mice.** J Neurochem. **110(1)**:12-22.
25. Derrien M., Pizzato N., Dolcini G., Menu E., Chaouat G., Lenfant F., Barré-Sinoussi F., Bouteiller PL. (2004) **Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1.** J Gen Virol. **85(Pt 7)**:1945-54.
26. Dhingra S., Sharma AK., Arora RC., Slezak J., Singal PK. (2009) **IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis.** Cardiovasc Res. **82(1)**:59-66.
27. Dhingra S., Sharma AK., Singla DK., Singal PK. (2007) **p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. **293(6)**:H3524-31.
28. Dimitriadis E., White CA., Jones RL., Salamonsen LA. (2005) **Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation.** Hum Reprod Update. **11(6)**:613-30.
29. Donaghy L., Gros F., Amiot L., Mary C., Maillard A., Guiguen C., Gangneux JP. (2007) **Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis.** Clin Exp Immunol. **147(2)**:236-40.
30. Dong Q., Fan R., Zhao S., Wang Y. (2009) **Over-expression of SOCS-3 gene promotes IL-10 production by JEG-3 trophoblast cells.** Placenta. **30(1)**:11-4.
31. Dubinsky V., Poehlmann TG., Suman P., Gentile T., Markert UR., Gutierrez G. (2010) **Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells.** Am J Reprod Immunol. **63(3)**:193-9.
32. Fainardi E., Rizzo R., Castellazzi M., Stignani M., Granieri E., Baricordi OR. (2009) **Potential role of soluble human leukocyte antigen-G molecules in multiple sclerosis.** Hum Immunol. **70(12)**:981-7.
33. Fitzgerald JS., Toth B., Jeschke U., Schleussner E., Markert UR. (2009) **Knocking off the suppressors of cytokine signaling (SOCS): their roles in mammalian pregnancy.** Reprod Immunol. **83(1-2)**:117-23.
34. Fitzgerald JS., Tsareva SA., Poehlmann TG., Berod L., Meissner A., Corvinus FM.,

- Wiederanders B., Pfitzner E., Markert UR., Friedrich K. (2005) **Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells.** Int J Biochem Cell Biol. **37(11)**:2284-96.
35. Fujii T., Ishitani A., Geraghty DE. (1994) **A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4.** J Immunol. **153(12)**:5516-24.
36. **Gadina M., Hilton D., Johnston JA., Morinobu A., Lighvani A., Zhou YJ., Visconti R., O'Shea JJ. (2001) Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after.** Curr Opin Immunol. **13(3)**:363-73.
37. Geraghty D.E., Koller B.H., Orr H.T. (1987) **A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment.** Proc Natl Acad Sci U S A. **84(24)**:9145–9149.
38. Grabowska A., Chumbley G., Carter N., Loke YW. (1990) **Interferon-gamma enhances mRNA and surface expression of class I antigen on human extravillous trophoblast.** Placenta. **11(4)**:301-8.
39. Griffith TS., Brunner T., Fletcher SM., Green DR., Ferguson TA. (1995) **Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege.** Science. **270(5239)**:1189-92.
40. Hackmon R., Koifman A., Hyodo H., Glickman H., Sheiner E., Geraghty DE. (2007) **Reduced third-trimester levels of soluble human leukocyte antigen G protein in severe preeclampsia.** Am J Obstet Gynecol. **197(3)**:255.e1-5.
41. Hans Donat **Immunologie der menschlichen Reproduktion** VEB Georg Thieme Leipzig
42. Heikkinen J., Möttönen M., Alanen A., Lassila O. (2004) **Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua.** Clin Exp Immunol. **136(2)**:373-8.
43. Heim MH. (1999) **The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus.** J Recept Signal Transduct Res. **19(1-4)**:75-120.
44. Heinrich PC., Behrmann I., Haan S., Hermanns HM., Müller-Newen G., Schaper F. (2003) **Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.** Biochem J. **374(Pt 1)**:1-20.
45. Hill JA., Polgar K., Anderson DJ. (1995) **T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion.** JAMA **273(24)**:1933-6.
46. Hirano T., Ishihara K., Hibi M. (2000) **Roles of STAT3 in mediating the cell growth,**

- differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors.** *Oncogene*. **19(21)**:2548-56.
47. Huang Y., Zhu XY., Du MR., Wu X., Wang MY., Li DJ. (2006) **Chemokine CXCL16, a scavenger receptor, induces proliferation and invasion of first-trimester human trophoblast cells in an autocrine manner.** *Hum Reprod*. **21(4)**:1083-91.
 48. Hunt Joan S., Margaret G. Petroff, ramsey H. McIntire, Carole Ober. (2005) **HLA-G and immune tolerance in pregnancy.** *The FASEB J*. **19**:681-693.
 49. Indira Guleria, Mohamed H. Sayegh. (2007) **Maternal Acceptance of the Fetus: True Human Tolerance.** *J. Immunol*. **178**:3345-3351.
 50. Ishitani A., Geraghty D.E. (1992) **Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens.** *Proc Natl Acad Sci* **89(9)**:3947-3951.
 51. James D.Watson, Nancy H. Hopking, Jeffrey W, Roberts. Joan Argetsinger Steitz, Alan M, Weiner. **Molecular Biology of the Gene**, fourth edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
 52. Jeremy M.Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, **Biochimie**
Aus dem Englischen übersetzt von Johannes Guglielmi, Andreas Held, Susanne Kuhlmann-Krieg, Brigitte Pfeiffer-Guglielmi, Karin von der Saal, Lothar Seidler, Sebastian Vogel und Ulrike Ziegra 5 Auflage, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg. Berlin
 53. Jin LP., Chen QY., Zhang T., Guo PF., Li DJ. (2009) **The CD4+CD25 bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage.** *Clin Immunol*. **133(3)**:402-10.
 54. Junqueira LC., Carneiro J., Kelley RO. Herausgegeben von M. Gratzl. **Histologie**. 5. Aufl., Springer, 2002
 55. Kämmerer Ulrike, Michael von Wolff, Udo R. Markert. (2004) **Immunology of human endometrium.** *Immunobiologie*. **209**:569-574.
 56. Kanai T., Fujii T., Kozuma S., Miki A., Yamashita T., Hyodo H., Unno N., Yoshida S., Taketani Y. (2003) **A subclass of soluble HLA-G1 modulates the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua additively to membrane-bound HLA-G1.** *J Reprod Immunol*. **60(2)**:85-96.
 57. Kanai T., Fujii T., Kozuma S., Yamashita T., Miki A., Kikuchi A., Taketani Y. (2001)

- Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture.** Mol Hum Reprod. **7(2)**:195-200.
58. Kang SM., Braat D., Schneider DB., O'Rourke RW., Lin Z., Ascher NL., Dichek DA., Baekkeskov S., Stock PG. (2000) **A non-cleavable mutant of Fas ligand does not prevent neutrophilic destruction of islet transplants.** Transplantation. **69(9)**:1813-7.
 59. Kauma SW., Huff TF., Hayes N., Nilkaeo A. (1999) **Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus.** J Clin Endocrinol Metab. **84(6)**:2188-94.
 60. Keith L. Moore, T. Vidhya N. Persaud. Übersetzt und bearbeitet von Christoph Viebahn. **Embryologie. Entwicklungsstadien – Frühentwicklung – Organogenese – Klinik.** 6. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 2007
 61. Kirszenbaum M., Moreau P., Gluckman E., Dausset J., Carosella E. (1994) **An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes.** Proc Natl Acad Sci **91(10)**:4209-4213.
 62. Kong B., Isozaki T., Sasaki S. (1996) **IL-6 antisense-mediated growth inhibition of a choriocarcinoma cell line: an intracellular autocrine growth mechanism.** Gynecol Oncol. **63(1)**:78-84.
 63. Krebs DL., Hilton DJ. (2001) **SOCS proteins: negative regulators of cytokine signalling.** Stem Cells. **19(5)**:378-87.
 64. Kumagai K., Ito K., Ando Y., Hakamata S., Teranishi M., Nakayama H., Manabe S. (2009) **Neutralization of IL-10 exacerbates cycloheximide-induced hepatocellular apoptosis and necrosis.** Toxicol Pathol. **37(4)**:536-46.
 65. Lajoie J., Fontaine J., Tremblay C., Routy JP., Poudrier J., Roger M. (2009) **Persistence of high levels of blood soluble human leukocyte antigen-G is associated with rapid progression of HIV infection.** AIDS. **23(11)**:1437-40.
 66. Le Bouteiller P. (2000) **HLA-G in the human placenta: expression and potential functions.** Biochem Soc Trans. **28(2)**:208-12.
 67. Lesport E., Baudhuin J., LeMaoult J., Sousa S., Doliger C., Carosella ED., Favier B. (2009) **Human melanoma cell secreting human leukocyte antigen-G5 inhibit natural killer cell cytotoxicity by impairing lytic granules polarization toward target cell.** Hum Immunol. **70(12)**:1000-5.

68. Lindaman A., Dowden A., Zavazava N. (2006) **Soluble HLA-G molecules induce apoptosis in natural killer cells.** Am J Reprod Immunol. **56(1)**:68-76.
69. Liu HY., Gu WR., Li XT. (2008) **Effects on human leukocyte antigen-G on proliferation and invasion of JEG-3 cell line.** Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. **43(6)**:445-50.
70. Liu N., DU HW., Chen RH., Zheng A., Huang HP., Wu ZH. (2007) **The effect of interleukin-10 on neurocyte apoptosis in cerebral ischemia in rats.** Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. **23(6)**:498-500.
71. Loke YW., Whyte A., eds. (1983) **Human trophoblast in culture** Biology of Trophoblast 663-701.
72. Mallet V., Pröll J., Solier C., Aquerre-Girr M., DeRossi M., Loke YW., Lenfant F., Le Bouteiller P. (2000) **The full length HLA-G1 and no other alternative form of HLA-G is expressed at the cell surface of transfected cells.** Hum Immunol. **61(3)**:212-24.
73. Manaster I. and Mandelboim O. (2008) **The Unique Properties of Human NK Cells in the Uterine Mucosa Placenta** **29(1)**: Pages 60-66.
74. Margaret G., Petroff. (2005) **Immune interactions at the maternal-fetal interface.** J. of Reprod. Immunol. **68(1-2)**: pages 1-13.
75. McCormick J., Whitley GS., Le Bouteiller P., Cartwright JE. (2009) **Soluble HLA-G regulates motility and invasion of the trophoblast-derived cell line SGHPL-4.** Hum Reprod. **24(6)**:1339-45.
76. Moreau P., Carosella E., Gluckman E., Gourand L., Prost S., Dausset J., Kirszenbaum M. (1995) **Alternative transcripts of the MHC of the non-classical class I HLA-G gene in the in trophoblast during the first pregnancy trimester and in the placenta at term.** C R Acad Sci III. **318(8)**:837-42.
77. Moreau P., Rousseau P., Rouas-Freiss N., Le Discorde M., Dausset J., Carosella ED. (2002) **HLA-G protein processing and transport to the cell surface.** Cell Mol Life Sci. **59(9)**:1460-6.
78. Munn D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T., Bondarev I., Pashine A., Mellor A.L. (1999) **Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism.** J. Exp. Med. **189** pp 1363-1372.
79. Naji A., Durrbach A., Carosella ED., Rouas-Freiss N. (2007) **Soluble HLA-G and HLA-G1 expressing antigen-presenting cells inhibit T-cell alloproliferation through ILT-**

- 2/ILT-4/FasL-mediated pathways.** Hum Immunol. **68(4)**:233-9.
80. Ni X., Luo S., Minegishi T., Peng C. (2000) **Activin A in JEG-3 cells: potential role as an autocrine regulator of steroidogenesis in humans.** Biol Reprod. **62(5)**:1224-30.
81. Onno M., Guillaudeux T., Amiot L., Renard I., Drenou B., Hirel B., Girr M., Semana G., Le Bouteiller P., Fauchet R. (1994) **The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues.** Hum immunol. **41(1)**:79-86.
82. O'Shea JJ. (1997) **Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet?** Immunity. **7(1)**:1-11.
83. Pang ZJ., Zhou JG., Huang LP. (2008) **Interleukin-10 may participate in regulating trophoblast invasion in human placentae throughout gestation.** Am J Reprod Immunol. **60(1)**:19-25.
84. Parhar R.S., Kennedy T.G., Lala P.K. (1988) **Suppression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua. I. Characterization of suppressor cells and suppressor molecules.** Cell. Immunol. **116(2)**:392-410.
85. Park B., Lee S., Kim E., Chang S., Jin M., Ahn K. (2001) **The Truncated cytoplasmic Tail of HLA-G serves a Quality-control function in post-ER compartments.** Immunity **15(2)**:213-24.
86. Park GM., Lee S., Park B., Kim E., Shin J., Cho K., Ahn K. (2004) **Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis.** Biochem Biophys Res Commun. **313(3)**:606-11.
87. Puppo F., Contini P., Ghio M., Indiveri F. (2002) **Soluble HLA class I molecules/CD8 ligation trigger apoptosis of CD8+ cells by Fas/Fas-ligand interaction.** ScientificWorldJournal. **2**:421-3.
88. Paul P., Cabestre FA., Ibrahim EC., Lefebvre S., Khalil-Daher I., Vazeux GR., Quiles M., Bermond F., Dausset J. and Carosella ED. (2000) **Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells.** Hum Immunol. **61(11)**:1138–1149.
89. Pérez-Pérez A., Maymó J., Dueñas JL., Goberna R., Calvo JC., Varone C., Sánchez-Margalet V. (2008) **Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway.** Arch Biochem Biophys. **477(2)**:390-5.
90. Phillips TA., Ni J., Hunt JS. (2001) **Death-inducing tumour necrosis factor (TNF) superfamily ligands and receptors are transcribed in human placentae,**

- cytotrophoblasts, placental macrophages and placental cell lines. *Placenta*. **22(8-9)**:663-72.
91. Plaisier M., Rodriques S., Willems F., Koolwijk P., van Hinsbergh V.W., Helmerhorst F.M. (2007) **Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues.** *Fertil Steril*. **88(1)**:176-87.
 92. Poehlmann Tobias G., Andreas Schaumann, Susann Busch, Justine S. Fitzgerald, Marise Aguerre-Girr, Philippe le Bouteiller, Ekkehard Schleussner. Udo R. Markert. (2006) **Inhibition of Term Decidual NK cell cytotoxicity by soluble HLA-G1.** *American Journal of Reproductive immunology*. **56**:275-285.
 93. Rieger L., Hofmeister V., Probe C., Dietl J., Weiss E.H., Steck T., Kämmerer U. (2002) **Th1- and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E.** *Mol Hum Reprod*. **8(3)**:255-61.
 94. Rinke de Wit TF., Vloemans S., Van den Elsen PJ., Haworth A., Stern PL. (1990) **Differential expression of the HLA class I multigene family by human embryonal carcinoma and choriocarcinoma cell lines.** *J Immunol*. **144(3)**:1080-7.
 95. Riteau B., Rouas-Freiss N., Menier C., Paul P., Dausset J., Carosella ED. (2001) **HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity.** *J Immunol*. **166(8)**:5018-26.
 96. Rizzo R., Fuzzi B., Stignani M., Criscuoli L., Melchiorri L., Dabizzi S., Campioni D., Lanza F., Marzola A., Branconi F., Noci I., Baricordi OR. (2007) **Soluble HLA-G molecules in follicular fluid: a tool for oocyte selection in IVF?** *J Reprod Immunol*. **74(1-2)**:133-42.
 97. Rizzo R., Hviid TV., Govoni M., Padovan M., Rubini M., Melchiorri L., Stignani M., Carturan S., Grappa MT., Fotinidi M., Ferretti S., Voss A., Laustrop H., Junker P., Trotta F., Baricordi OR. (2008) **HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus.** *Tissue Antigens*. **71(6)**:520-9.
 98. Rizzo R., Rubini M., Govoni M., Padovan M., Melchiorri L., Stignani M., Carturan S., Trotta F., Baricordi OR. (2006) **HLA-G 14-bp polymorphism regulates the methotrexate response in rheumatoid arthritis.** *Pharmacogenet Genomics*. **16(9)**:615-23.

99. Roth I., Corry DB., Locksley RM., Abrams JS. Litton MJ., Fisher SJ. (1996) **Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10.** J Exp Med. **184(2)**:539-48.
100. Roth I., Fisher SJ. (1999) **IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion.** Dev Biol. **205(1)**:194-204.
101. Roussev RG., Coulam CB. (2007) **HLA-G and its role in implantation (review).** J Assist Reprod Genet. **24(7)**:288-95.
102. Saito S. (2000) **Cytokine network at the feto-maternal interface.** J Reprod Immunol. **47(2)**:87-103.
103. Saito S., Sasaki Y., Sakai M. (2005) **CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy.** J Reprod Immunol. **65(2)**:111-20.
104. Sakuragi N., Matsuo H., Coukos G., Furth EE., Bronner MP., VanArsdale CM., Krajewsky S., Reed JC., Strauss JF 3rd. (1994) **Differentiation-dependent expression of the BCL-2 proto-oncogene in the human trophoblast lineage.** J Soc Gynecol Investig. **1(2)**:164-72.
105. Santiago-Lomelí M., Gómez-Quiroz LE., Ortíz-Ortega VM., Kershenobich D., Gutiérrez-Ruiz MC. (2005) **Differential effect of interleukin-10 on hepatocyte apoptosis.** Life Sci. **76(22)**:2569-79.
106. Sargent IL. (1993) **Maternal and fetal immune responses during pregnancy.** Exp. Clin. Immunogenet. **10(2)**:85-102.
107. Sasaki Y., Sakai M., Miyazaki S., Higuma S., Shiozaki A., Saito S. (2004) **Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases.** Mol Hum Reprod. **10(5)**:347-53.
108. Schröcksnadel H., Baier-Bitterlich G., Dapunt O. Wachter H., Fuchs D. (1996) **Decreased plasma tryptophan in pregnancy.** Obstet Gynecol. **88(1)**:47-50.
109. Schuler M. und Green DR. (2001) **Mechanisms of p53-dependent apoptosis.** Biochemical Society Transactions **29(6)**:684-688.
110. Sebti Y., Le Maux A., Gros F., De Guibert S., Pangault C., Rouas-Freiss N., Bernard M., Amiot L. (2007) **Expression of functional soluble human leucocyte antigen-G molecules in lymphoproliferative disorders.** Br J Haematol. **138(2)**:202-12.
111. Sokolov DI., Kolobov AV., Lesnichija MV., Kostiouchek IN., Stepanova Ol., Kvetnoy IM., Selkov SA. (2009) **Regulatory Mechanisms for Apoptosis in Placental Tissue during Normal Pregnancy and Gestosis-Complicated Pregnancy.** Bull Exp Biol Med.

- 148(5):766-70.**
112. Starkey P.M., Clover L.M., Rees M.C. (1991) **Variation during the menstrual cycle of immune cell populations in human endometrium.** Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 10; **39(3):203-7.**
 113. Sun LL., Han Y., Chen JH., Yao YQ. (2008) **Down-regulation of HLA-G boosted natural killer cell-mediated cytotoxicity in JEG-3 cells cultured in vitro.** Fertil Steril. **90(6):2398-405.**
 114. Tai JD., Wang GY., Liu TJ., Wang L., Li F. (2009) **Effect of siRNA targeting c-Myc and VEGF on human colorectal cancer cells.** Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi. **12(5):502-6.**
 115. Thaxton JE., Sharma S. (2010) **Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy.** Am J Reprod Immunol.
 116. Thomas W. Sadler, Begründet von Jan Langman, deutsche Übersetzung von Ulrich Drews, **Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen.** 10. Aufl., Georg Thieme Verlag, 2003
 117. Torres MI., Le Discorde M, Lorite P., Ríos A., Gassull MA., Maldonado J., Dausset J., Carosella ED. (2004) **Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease.** Int Immunol. **16(4):579-83.**
 118. Touw IP., De Koning JP., Ward AC., Hermans MH. (2000) **Signaling mechanisms of cytokine receptors and their perturbances in disease.** Mol Cell Endocrinol. **160(1-2):1-9.**
 119. Vacchio MS., Hodes RJ. (2005) **Fetal expression of Fas ligand is necessary and sufficient for induction of CD8 T cell tolerance to the fetal antigen H-Y during pregnancy.** J Immunol. **174(8):4657-61.**
 120. Velásquez-Lopera MM., Correa LA., García LF. (2008) **Human spleen contains different subsets of dendritic cells and regulatory T lymphocytes.** Clin Exp Immunol. **154(1):107-14.**
 121. Watanabe M., Iwatani Y., Kaneda T., Hidaka Y., Mitsuda N., Morimoto Y., Amino N. (1997) **Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy.** Am J Reprod Immunol. **37(5):368-77.**
 122. Wegmann T.G., Lin H., Guilbert L., Mosmann T.R. (1993) **Bidirectional cytokine**

- interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?** Immunol. Today. **14(7)**:353-6.
123. Wengenmayer T., Poehlmann TG., Markert UR. (2004) **Inhibition of HLA-G production in JEG-3 choriocarcinoma cells by RNA interference** AJRI **51**:189-191.
 124. Wiendl H., Feger U., Mittelbronn M., Jack C., Schreiner B., Stadelmann C., Antel J., Brueck W., Meyermann R., Bar-Or A., Kieseier BC., Weller M. (2005) **Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity.** Brain. **128(Pt 11)**:2689-704.
 125. Wood KJ., Ushigome H., Karim M., Bushell A., Hori S., Sakaguchi S. (2003) **Regulatory cells in transplantation.** Novartis Found Symp. **252**:177-88; discussion 188-93, 203-10.
 126. Yang Y., Geraghty DE., Hunt JS. (1995) **Cytokine regulation of HLA-G expression in human trophoblast cell lines.** J Reprod Immunol. **29(3)**:179-95.
 127. Zeng L., O'Connor C., Zhang J., Kaplan AM., Cohen DA. (2010) **IL-10 promotes resistance to apoptosis and metastatic potential in lung tumor cell lines.** Cytokine. **49(3)**:294-302.
 128. Zhang N., Schröppel B., Lal G., Jakubzick C., Mao X., Chen D., Yin N., Jessberger R., Ochando JC., Ding Y., Bromberg JS. (2009) **Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response.** Immunity. **30(3)**:458-69.
 129. Zhong J., Deaciuc IV., Burikhanov R., de Villiers WJ. (2006) **Lipopolysaccharide-induced liver apoptosis is increased in interleukin-10 knockout mice.** Biochim Biophys Acta. **1762(4)**:468-77.
 130. Zygmunt M., Hahn D., Münstedt K., Bischof P., Lang U. (1998) **Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro.** Placenta. **19(8)**:587-93.

9 Publikationen

10 Lebenslauf

Name: Dzonang Nzondjou
Vorname: Arsène
Adresse: Virchowstr. 7; Appartement 2/7
31737 Rinteln
E-Mail: arsennn@yahoo.de
Geburtsjahr: 26.08.1980
Geburtsort: Mbouda-Ville
Staatsangehörigkeit: Kamerunisch

GRUNDSCHUL-UND SCHULAUSBILDUNG:

1985-1991: Etude primaire élémentaire à l'école publique groupe I de Mbouda.
1991-1999: Etude secondaire au lycée de Mbouda.
1999-2001: Deutschkurs im Goethe-Institut in Yaoundé und an der technischen Universität Clausthal Zellerfeld.

UNIVERSITÄTSAUSBILDUNG:

2001-2003: vorklinische Ausbildung an der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena.
2003-2009: klinische Ausbildung an der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena.
Seit 05.2005: Doctorand im Plazenta-Labor der Abteilung für Geburtshilfe in Jena.

FÖRDERUNG:

07/2004-10/2009: Stipendiat der FES.

FAMULATUREN:

09.02.-08.03.2004: Famulatur der Chirurgie an der Herz-Thorax und Gefäßchirurgie der

medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena.

22.03.-08.04.2004: 7 Kurs der tropischen Medizin an der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena.

01.08.-31.08.2004: Famulatur in der plastischen und Handchirurgie an der Klinik Großhadern München.

28.02.-03.04.2005: Famulatur im Ad-Lucem - Krankenhaus von Mbouda.

18.01.-16.02.2007: Praxisfamulatur in der Arztpraxis in Jena.

PRAKTISCHES JAHR:

25.02.-13.06.2008: PJ-Tertial innere Medizin am Klinikum der Friedrich-Schiller Universität Jena.

16.06.-03.10.2008: PJ-Tertial Chirurgie am Klinikum der Friedrich- Schiller Universität Jena.

06.10.-23.01.2009: PJ-Tertial in der Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum der Friedrich-Schiller Universität Jena.

WEITERBILDUNG:

01.07.2010-31.12.2010: Assistenzarzt im Kreiskrankenhaus Sigmaringen.

Aktuell: Assistenzarzt im Kreiskrankenhaus Rinteln, Klinikum Schaumburg.

11. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Udo R. Markert für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die sehr gute einführende Erklärung über das Arbeitsthema, die Diskussionsbereitschaft, die Bereitschaft meine Fragen zu beantworten und seiner Freundlichkeit.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. T. G. Poehlmann für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimenten.

Vielen Dank an der gesamten Mannschaft des Plazentalabors für Hilfbereitschaft, Nettigkeit und die sehr guten Vorträge.

Vielen Dank an der Familie Egbe für ihre Hilfe während des Studiums.

Ich bedanke mich bei der Familie Baffoe für ihre Unterstützung.

Ich bedanke mich bei meiner Familie für ihre Unterstützung.

12. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. U. Markert, Dr. T. G. Poehlmann.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.